ATMタンパク質とp53との相互作用の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 李, 英珠 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9399

金沢大学十全医学会雑誌　第108巻　第1号　68－76（1999）

ATMタンパク質とp53との相互作用の解析

金沢大学がん研究所細胞制御研究部門細胞分子病態研究分野（主任：山本健一教授）
李　　英　珠

毛細血管拡張性小脳失調症 (ataxia-telangiectasia, AT) の病因遺伝子であるatm (ataxia-telangiectasia mutated) は，ホスファチジルイノシトール-3キナーゼファミリーメンバーとして細胞周期のチェックポイントやDNA損傷に対する応答などに重要な役割をしている．一方，AT細胞は電離放射線に過敏で，照射後腫瘍抑制タンパク質p53の誘導が認められないことから，atm遺伝子がコードするタンパク質ATMはp53の上流でp53の活性化と安定性の増強を誘導するのではないかと考えられているが，まだ不明な点が多い．本研究では，全長及び欠失型ATM cDNAを用い，ATMタンパク質とp53の相互作用について解析した．まず，N末端にHAを標識したATM cDNAを組み込んだ発現ベクターを細胞に導入し，ウエスタンブロット法により予想された大きさのATMタンパク質が発現することを認めた．ATMタンパク質とp53の結合については細胞抽出液を免疫沈澱後にウエスタンブロットを行うことにより示した．また，細胞抽出液をDNase A処理し免疫沈澱後にウエスタンブロットで解析して，この結合はDNAを介さないで直接結合することを確かめた．更に，試験管内でいくつかの欠失型ATMタンパク質を合成し，GST-p53融合タンパク質との結合実験より，ATMのC末端2139番目のアミノ酸から2426番目のアミノ酸までの領域がp53との特異的結合に関与する領域として同定された．

Key words　ataxia-telangiectasia(AT), AT-mutated (ATM), p53, binding domain, interaction

毛細血管拡張性小脳失調症 (ataxia-telangiectasia, AT) は原発性免疫不全に分類される常染色体劣性遺伝病で，毛細血管拡張，進行性小脳変性による運動失調，また顕著な免疫不全に伴う反復性感染症，放射線高感受性，染色体不安定性，アポトーシス異常，発育遅延や早期老化などの全身症状を特徴とする[1)2)]．ATは劣性の稀な遺伝病であるが，ホモ接合の患者ではリンパ腫，ホジキン (Hodgkin) 病，白血病などのリンパ網内系の腫瘍の発生率が正常人に比べ100倍も高いことが報告されており，ほとんどの患者は25歳までに悪性腫瘍により亡くなる[3)4)]．ヘテロ接合の保因者は約100人に1人存在すると推測され，免疫不全症状がないにもかかわらず悪性腫瘍の発症の危険率が高く，とくに女性保因者では正常の女性に比べ乳癌の発生の危険率が5倍近く高い[5)6)]．このことはATの病因遺伝子の異常自体が発癌機構に密接に関与していることを示唆している．

AT患者の細胞は電離放射線やDNA損傷効果をもつ化学物質に感受性が高く，放射線抵抗性DNA合成 (radioresistant DNA synthesis)[2)7)] を示す．その分子機構の詳細は不明であるが[8)]，細胞周期チェックポイントにおける異常であると考えられている．この欠損はS期で顕著に現れ，G_1-S期，G_2-M期にも見られる[9)~11)]．また，AT患者細胞では，欠失，転座，テロメアの短小化やテロメア同士の融合などの染色体不安定化が顕著であり[12)13)]，正常人由来の細胞に比べると試験管内においてAT細胞は寿命が短く，血清由来の増殖因子に依存的である[8)]．

最近ポジショナルクローニングにより，ATの原因遺伝子としてATM (ataxia-telangiectasia mutated) 遺伝子が，11q22.3領域から単離された．相補性テストからATはatmという単一遺伝子に起因することが明らかになった[14)15)]．atm遺伝子は660のエクソンから成り，12キロ塩基 (kilo base, kb) の転写産物，350.6kDaのタンパク質ATMをコードし，細胞周期のチェックポイントや減数分裂組み換え，テロメアの長さの監視，DNA損傷に対する応答などに関与するホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol, PI) -3キナーゼ (phosphatidylinositol-3 kinase) 類似酵素のファミリーに属している[16)~19)]．ATM，特にそのC末端側のPI-3キナーゼ領域と相同性の高い遺伝子は酵母からヒトに至るまでいくつかの種から単離されている．これらの遺伝子ファミリーには，酵母ではDNA損傷，修復，DNA複製チェックポイントに関与するRad3やMec1またテロメア長の維持に関わるTEL1，2があり，ヒトではATM類似遺伝子，FRAP，ATR/FRP1，DNA-PKcsがある．

これまでのところ，ATMの機能に関してまだ明確ではないが，AT細胞において放射線に対するp53タンパク質の誘導が不完全なことから，ATM遺伝子産物がp53タンパク質の蓄積に関与している可能性が示唆されている．本研究ではATM全長のcDNAを用い，ATMとp53の相互作用についてを検討した．

平成10年11月19日受付，平成11年1月11日受理

Abbreviations：AT, ataxia telangiectasia; ATM, ataxia telangiectasia mutated; CDK, cyclin dependent kinase; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; DTT, dithiothreitol; FCS, felal calf serum; GADD45, growth arrest and DNA damage factor; GST, Glutathione S transferase; HA, hemagglutinin; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA,

対象および方法

Ⅰ．使用細胞とその培養条件

使用した細胞はアフリカミドリザルの腎臓上皮由来COS-7細胞株である．培養液にはダルベッコウ変法イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) (日水，東京) に50 μg/mlペニシリンとストレプトマイシン (Gibco BRL, Rockville, USA)，2.5 μg/mlファギゾン (Gibco BRL)，2mMグルタミン (和光純薬，大阪)，10%牛胎児血清 (felal calf serum, FCS) (Intergen, New York, USA) を添加したものを使用した．5%炭酸ガス通気の培養装置において37℃で培養を行い，3日ごとに新鮮な培地と交換をし，細胞密度が80%の細胞を用いた．

Ⅱ．ヒトATM遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

1．材　料

λgt11ヒト胎児肺cDNAライブラリーはClontech社 (Palo Alto, USA) から購入した．

2．プローブDNAの作製

1)．λgt11 cDNAよりATMの塩基対断片3529-4893をPCR (Template PCR system-Expand™ Long, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) により合成した．さらにpBluescript II KS$^+$(Stratagene, La Jolla, USA)ベクターを用いてその断片のサブクローニングを行い，塩基配列を確認した．

2)．ATM断片7788-8990塩基対は金沢大学薬学部分子細胞薬学 (山下克美助教授) より供与された．

3．cDNAライブラリーのスクリーニング

λファージライブラリーを5×10^{4}プラーク形成単位/15cmプレートの濃度になるように懸濁溶液［100mM塩化ナトリウム (NaCl)，10mM塩化マグネシウム ($MgCl_2$)，50mM Tris-HCl (pH 7.5)，0.01%ゼラチン］で希釈し，宿主大腸菌Y1090に希釈ファージを37℃で15分間吸着感染させた後，0.7%アガロース (Gibco BRL) を加えたNZCYM培地 (1% NZアミン，0.5%酵母エキス，0.02% $MgSO_4$，0.5% NaCl) と混和し，15cm NZCYM寒天培地上に重層し37℃で12時間培養をしてファージプラークを形成させた．ファージをニトロセルロース膜OPTITRAN BA-S 85 (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) に転写し，転写後のメンブランを室温にて変性溶液［0.5M水酸化ナトリウム (NaOH)，1.5M NaCl］で1分間浸した後，中和溶液［1.5M NaCl, 1M Tris-HCl (pH7.5)］に2分間浸してから乾燥させた．さらに，変性したフィルターを濾紙の間に挟んで，80℃で2時間ベーキングを行った．フィルターを50mlのハイブリダイゼーション溶液［6×SSC (300mM NaCl，30mMクエン酸ナトリウム)，0.1% SDS，5×Denhardt溶液，1 μg/ml変性超音処理サケ精子DNA］を加え65℃で4時間プレハイブリダイゼーションを行った．プローブの標識はランダムプライマーラベリングキット (Stratagene) を用いて行った．標識したプローブを加えて，65℃で12時間ハイブリダイゼーションを行った後，2×SSC-0.1%SDS溶液で室温にて洗浄をし，さらに0.2×SSC-0.1%SDS溶液で55℃で30分間の洗浄を2回行い，メンブランを乾燥させた後，カセットの中にこのメンブランとフィルムを入れて－80℃フリーザーの中で12時間露光し，現像を行った．

一次スクリーニングから得られた陽性プラークのファージを10cmプレートあたり100プラーク形成単位の濃度に懸濁溶液にて希釈し，一次スクリーニングと同様な方法で再スクリーニングを行った．単独のプラークを形成している陽性のもの20個を，目的のファージクローンとして単離した．

4．ファージDNAの解析

陽性プラークのファージDNAから目的領域を同定するために，λgt11とATM cDNAの制限酵素地図を利用し，いくつかの酵素でファージDNAを切断してサザンブロットを行った．一つのファージDNAより全長(1-3056 アミノ酸)，および2種類のN末端欠失ATM (1302-3056アミノ酸および2139-3056アミノ酸)に相当するDNA断片をN末端にインフルエンザウィルス血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 標識を付けて，クローニングベクター(pBluescript II KS$^-$)と発現ベクター (pEF-BOS，長田重一教授[20] より供与された) にサブクローニングした．塩基配列は両相補鎖ともについて確認をした．

Ⅲ．培養細胞におけるATMの発現

1．培養細胞への遺伝子導入

60mm細胞培養用ディッシュ (Falcon, New Jersey, USA) に約2×10^6/ml濃度の培養細胞 (COS-7細胞) と10%FCS含有DMEM培地5mlを入れて，37℃で24時間培養をした後，遺伝子導入を行った．遺伝子導入方法はLopataら[21] のDEAE-デキストラン法を用いた．まず，培養細胞の入った培養デイッシュの培地を除いて，1×トリス塩酸緩衝液 (Tris-bufferd saline, TBS) (+)［30mM NaCl，1.3mM塩化カリウム (KCl)，0.1mMリン酸水素二ナトリウム・12水塩 ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)，62mM Tris-HCl (pH 7.5)，0.49mM $MgCl_2$，0.68mM塩化カルシウム ($CaCl_2$)］溶液で洗浄後，6 μgプラスミドDNA，50 μlの10mg/ml DEAE-デキストラン (Pharmacia, Uppsala, Sweden) と1mlの1×TBS (+) 溶液をよく混ぜて培養細胞の入った培養デイッシュに加え，室温で30分間放置した後FCS (-) のDMEM培地を4ml加えて90分間，37℃5%炭酸ガス通気の培養装置に入れた．その後FCS (-) のDMEM培地5mlで洗浄して，2mlの10%ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma, St. Louis, USA) 含有FCS (-) DMEM培地を加えて室温で2分間放置した後，FCS (-) DMEM培地で2回洗浄後10%FCS含有DMEM培地5mlを加えて37℃5%炭酸ガス通気の培養装置の中に入れて培養をした．

2．細胞の抽出方法及び細胞溶解液の調製

Ⅲ-1.で得られた細胞を冷却した1×リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で2回洗浄した後，ラバーホリスマンにて回収し，細胞懸濁液を4℃，2000rpm，5分間遠心をして細胞を集め，細胞溶解液［20mM Tris-HCl (pH7.4)，5mM EDTA，250mM NaCl，1%トリトンX-100 (Triton X-100)，0.25% デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate，和光純薬)，1mMフッ化フェニルメチルスルホニル (phenyl methlsulfonyl fluoride, PMSF) (和光純薬)，0.2Uアプロチニン (Aprotinin, Sigma)］を加えて超音波発生装置 (UR-20P型，トミー精工株式会社，東京) にて細胞を破砕した後，4℃，12,000rpm，20分間遠心を行い沈澱物を除去して抽出液を得た．

3．ウエスタンブロット法

Ⅲ-2.で得た細胞抽出液200 μgと2×サンプルバッファー

---

proliferation cell nuclear antigen; PI-3 kinase, phosphatidylinositol-3 kinase; PMSF, phenylmethlsulfonyl fluoride; TBS, Tris-buffered saline.

[100mM Tris-HCl (pH 6.8), 20%グリセロール, 4%SDS, 200mMジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT), 0.2%ブロモフェノールブルー (bromophenol blue)] を等量ずつ混和し, 99℃で3分間変性した後, 6%または10%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行った. 泳動後のゲルをバイオトレースフィルター (日本ジェネティクス, 東京) に転写し, PBS-5%スキムミルク (雪印, 札幌) 溶液で1時間室温でブロッキングを行った. 続いて, フィルターをPBS-0.05%ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート (Tween-20, 和光純薬, 大阪) 溶液で洗浄し, 一次抗体としてHA (Boehringer Mannheim), ATM (Calbiochem, Cambridge, USA), あるいはp53抗体 (Calbiochem) を用い, 1時間室温で反応させた. その後, PBS-0.05% Tween-20溶液でフィルターを3回洗浄した後, 二次抗体として5 μg/ml西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase) 結合抗マウスIgG (Cappel, West Chester, USA) を加えて1時間室温で反応をさせた. その後, PBS-0.05% Tween-20溶液で洗浄し, ECLウエスタンブロッティング検知液 (Amersham) を用いて反応させ, 1分間フィルムへ露光後現像した.

Ⅳ. 遺伝子産物の生化学解析の評価

1. 免疫沈澱法

Ⅲ-2と同様な方法で細胞を集め, 細胞溶解液 [Hepes-KOH (pH 8.0), 150mM KCl, 2mM EDTA, 1mM DTT, 0.3% Nonidet P-40 (NP-40, Sigma), 0.3% Triton X-100, 1mM PMSF, 10mg/mlアプロチニン] に懸濁した細胞を氷冷下で超音波発生装置を用いて破砕し, 4℃, 12,000rpm, 20分間遠心した後, 上清に単クローン抗体を最終濃度が1mg/mlになるように加えて, 4℃で2時間反応させた後にプロテインG-Sepharose (Pharmacia) を加え4℃で12時間反応した. 反応後, 細胞溶解液を4回洗浄し, 2×サンプルバッファーを等量混和し, SDS-PAGEを行った後, ウエスタンブロッティング法を行った.

2. タンパク質間相互作用の検出 (GST-fusion法)

1). グルタチオンSトランスフェラーゼ (glutathione S transfrase, GST) 融合タンパク質の作製

発現ベクターPGEX-2TあるいはPGEX-3X (Pharmacia) を用いて目的のcDNAをベクターにフレームを合わせてサブクローニングした. 得られたプラスミドで形質転換された大腸菌HB101株をLB培地 (pH 7.6) 10ml [0.1gトリプトン (和光純薬), 0.05g酵母エキス (和光純薬), 0.05g NaCl, 100 μg/mlアンピシリン] 中で37℃で15時間培養した. その5ml培養液をLB培地100mlの入ったフラスコに加えて, 37℃で約2時間培養した. その後1/1000容量の0.2Mイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (宝酒造, 大津) を加えてGST-融合タンパク質の発現誘導を行った. 37℃で4時間培養後の培養液を4℃, 6,000rpm, 10分遠心して大腸菌を回収し, プロテアーゼインヒビター [protease inhibitor (4mM PMSF, 0.2Uアプロチニン)] を含むPBS 4mlで充分に懸濁して, 超音波細胞破砕器 (アストラソン, 和研薬, 京都) を用いて30秒間破砕した後に, 30秒間の氷上冷却を行う操作を5回繰り返した. その後10% Triton X-100を400 μl加え4℃, 7,000rpm, 10分間遠心して上清を回収した. 回収した上清にPBSで平衡化したグルタチオンアガロースビーズ4B (glutathione sepharose 4B, Pharmacia) を100 μl加え4℃で回転させた. 2時間後4℃, 1,000rpm, 30秒遠心をしてビーズを沈殿させ, PBS-0.1% Triton X-100で4回洗浄し, さらにPBSで2回洗浄をした. 得られたGST-融合タンパク質濃度をSDS-PAGEにて解析をした.

2). cDNAよりmRNAの試験管内転写

T3ファージプロモーターを持つpBluescript Ⅱ KS$^-$にサブクローニングしたcDNAをcDNAの停止コドンの下流に存在する制限酵素部位にて切断して, 直鎖状DNAとして, フェノール抽出とエタノール沈殿にて精製をした. その5 μgにRNA転写反応液バッファーキット (RNA Transcription Reagent Buffer Kit, Stratagene) を加え, 水で50 μlにした後, 37℃で1時間反応させた. 反応物をフェノール抽出した後エタノール沈澱によりmRNAの沈澱を得た. その沈澱を二炭酸ジエチル (diethyl pyrocarbonate) 処理を施した水に溶かし使用直前まで−70℃にて保存した.

3). タンパク質への試験管内翻訳

^{35}S標識したタンパク質は次のようにして試験管内で合成した. mRNAを, ウサギ網状赤血球溶出液システム (Rabbit Reticulocyte Lysate System, Promega, Wadison, USA), L-(^{35}S) メチオニン (室町化学, 東京), アミノ酸混合溶液 (-Met) (Promega), 及びRNaseインヒビター (Pharmacia) を含む合成反応液に加え, 30℃で1時間反応させた. 合成したタンパク質は使用直前まで-70℃にて保存した.

4). GST融合タンパク質共沈澱法

GST融合タンパク質を結合させグルタチオンアガロースビーズ6 μgに試験管内翻訳したタンパク質10 μlを加え, 緩衝液A [50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 0.5% (V/W) NP-40] で500 μlに合わせた. 4℃, 2時間回転した後, 1,000rpm, 30秒遠心し, 緩衝液Aでビーズを3回洗浄した. その後2×サンプルバッファーと等量混合して, SDS-PAGEを行った. 泳動後ゲルを固定液 [メタノール (和光純薬) 100ml, 酢酸 (和光純薬) 20ml, 蒸留水800ml] で15分間固定し, さらに増強液 (Amplify™, Amersham) で15分間処理した後, ゲルを乾燥させて−80℃で12時間72時間のオートラジオグラフィーを行った.

Ⅴ. DNase Aの処理

Ⅲ-2と同様の方法で細胞を回収して, 0.5ml細胞溶解液 [50mM Tris-HCl (pH 7.4), 50mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 0.2% Triton X-100, 0.3% NP-40, 1mM PMSF] に20 μlの1mg/ml DNase Aを加えて37℃で30分間反応させた後, 上清を免疫共沈澱法と同様の方法で処理をして, ウエスタンブロッティングを行った.

成　　績

Ⅰ. ATMタンパク質の発現

ATMの全長, 及び2種類のN末端欠失型 [1302-3056のアミノ酸配列と2139-3056のアミノ酸配列からなり, それぞれをATM (1302-3056), (2139-3056) とする] のcDNAをN末端にHA標識を持つ発現ベクター (pEF-BOS) に組み込んだ (図1A). 3種類のATM発現ベクターをCOS-7細胞に導入し, その発現をHA抗体を用いたウエスタンブロッティングで解析した. その結果, それぞれ350kDa, 193kDa, 101kDaのバンドが検出された. 対照実験として空の発現ベクターを用いた場合にはバンドは検出されなかった (図1B). 同じ試料についてATMのC末端を認識するポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティ

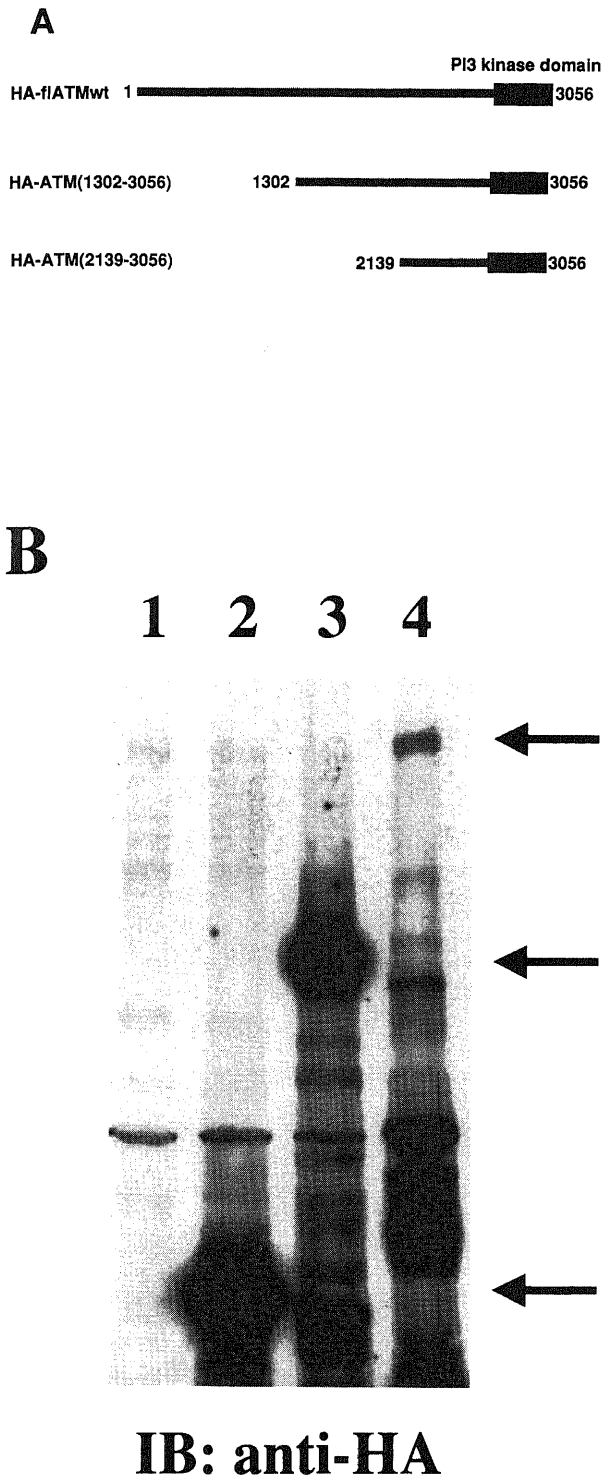


Fig. 1. Expression of the full-lenghth and truncated ATM cDNAs in COS-7 cells. (A) Diagram of the full-lenghth(flATMwt) and truncated ATM cDNAs cloned in the HA-tagged eukaryotic expression vectors. ATM proteins were named by using the number corresponding to the terminal amino acid residues. Black square boxes represent the catalytic PI-3 kinase domains. (B) The HA-tagged ATM expression vectors as indicated were transiently transfected into COS-7 cells. Cell extracts were analyzed by immunoblotting (IB) with the HA antibody. Lane 1, empty vector; lane 2, ATM (2139-3056); lane 3, ATM (1302-3056); lane 4, flATMwt. The arrows indicate the bands of ATM protein with expected moleculer wight.

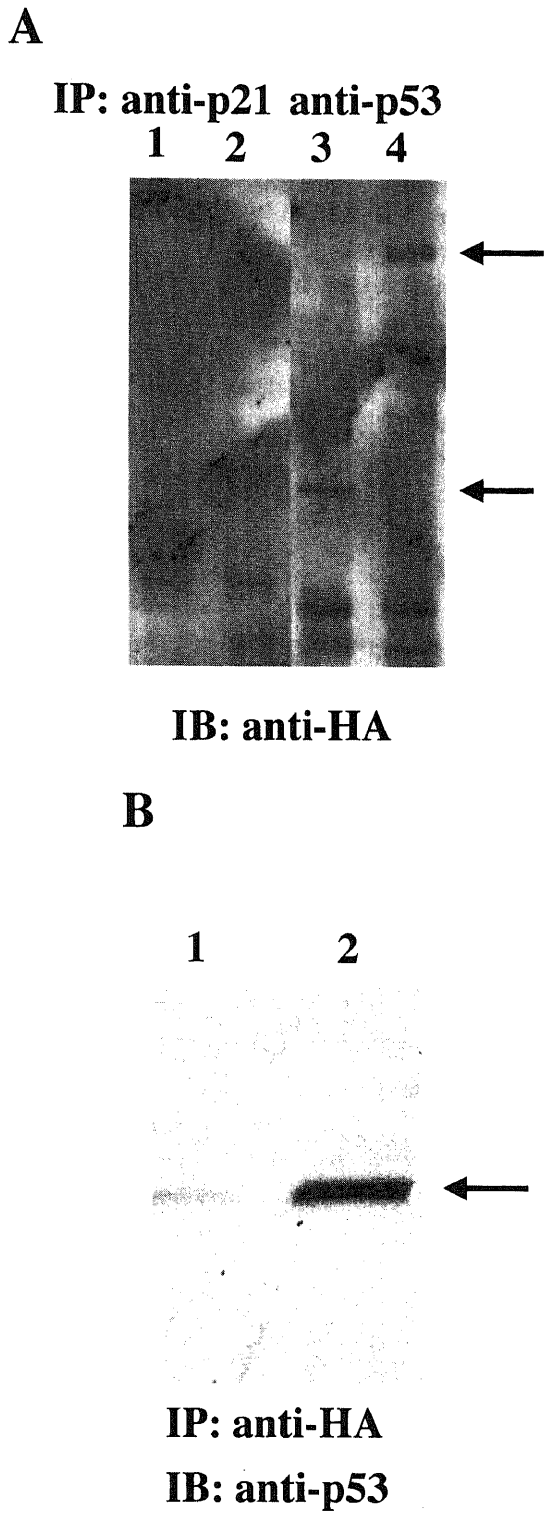


Fig. 2. *In vivo* association of ATM with p53. (A) The ATM expression vectors encoding ATM (2139-3056) and ATM (1302-3056) were transiently transfected into COS-7 cells. Cell extracts were immunopreciptated (IP) with either p53 antibody (lane3, 4) or p21 antibody (lane1, 2), and immunopreciptates were analyzed by immunoblotting using HA antibody. The arrows indicate the bands of ATM proteins. (B) Empty (lane 1) and ATM (2139-3056) (lane 2) expression vectors were transfected into COS-7 cells. Cell extracts were precipitated with HA antibody, and the immunoprecipitates were then analyzed by immunblotting using p53.antibody. The arrow indicates the band of p53.

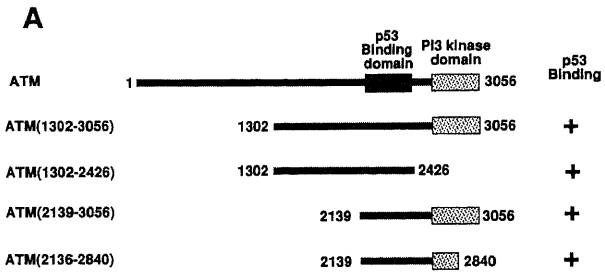
ングを行い，同様の結果を得た (データ未掲載).

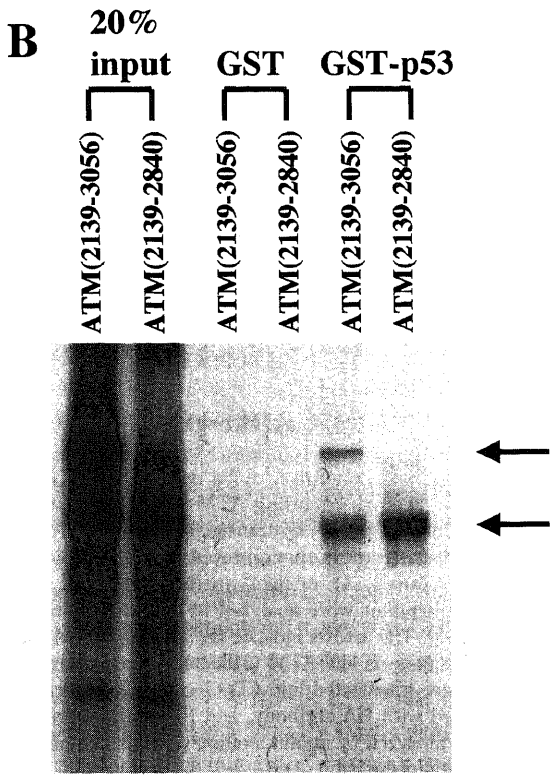
Ⅱ．細胞内でのATMとp53の結合実験

細胞内でATMがp53と直接結合するかどうかを免疫沈澱法により調べた．ATM (1302-3056)，ATM (2139-3056) を組み込んだATM発現ベクターをそれぞれCOS-7細胞に導入して，単クローンp53抗体またはp21抗体を用いて免疫沈澱した．この免疫沈澱したタンパク質をSDS-PAGEにかけ，単クローン抗体HAを用いたウエスタンブロッティングで解析した (図2A)．p53抗体を用いて免疫沈澱した試料はウエスタンブロッティング分析によりATMのバンドが検出されたが，p21抗体を用いて免疫沈澱した試料にはHA抗体と反応するATMのバンドが検出されなかった．逆に，ATM (2139-3056) 発現ベクターをCOS-7細胞に導入し抗HA抗体を用いて免疫沈澱し，p53抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った結果，p53のバンドが検出された (図2B)．以上の結果より，細胞内でATMのC末端領域を介して，ATMはp53と相互作用をしていると考えられた．

Ⅲ．ATMとp53の結合部位の決定

ATMのどの領域がp53との結合に必要であるかを試験管内でGST-融合タンパク質を用いて検討した．[^{35}S] -メチオニン (methionine) で標識したいくつかの欠失型ATMを試験管内タンパク質合成系で合成し，p53 (1-393アミノ酸) のGST-融合タンパク質と共存させて，結合を調べた (図3A)．その結果，ATMの2139-2426アミノ酸とGST-p53の結合を示すバンドが検出された．それに対し，GSTタンパク質のみでは結合を示すバンドは見られなかった (図3B)．さらに，ATMがp53のどの領域と結合するのかを検討した．p53はN末端の転写活性化ドメイン (1-101アミノ酸)，中央のDNA結合ドメイン (102-292アミノ酸)，そしてC末端の四量体形成ドメイン (293-393アミノ酸)





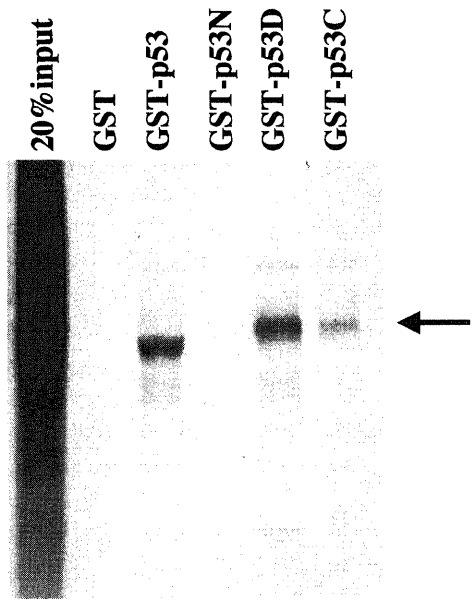
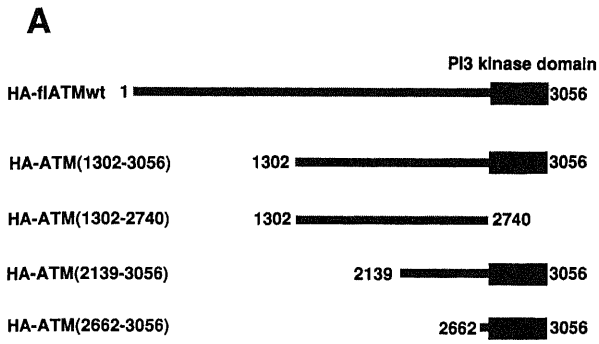
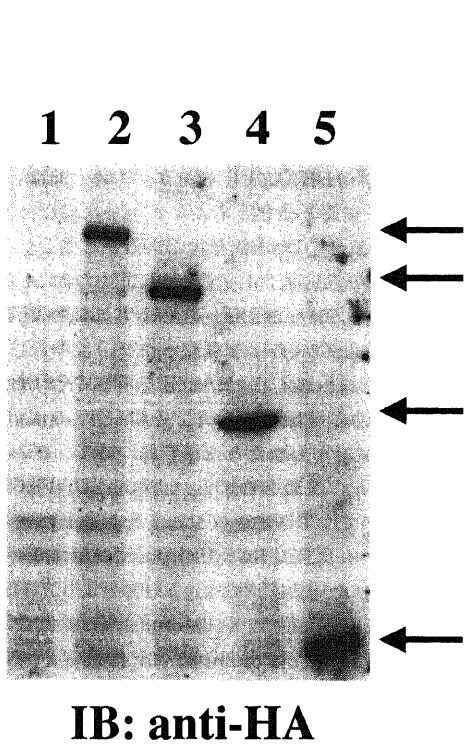
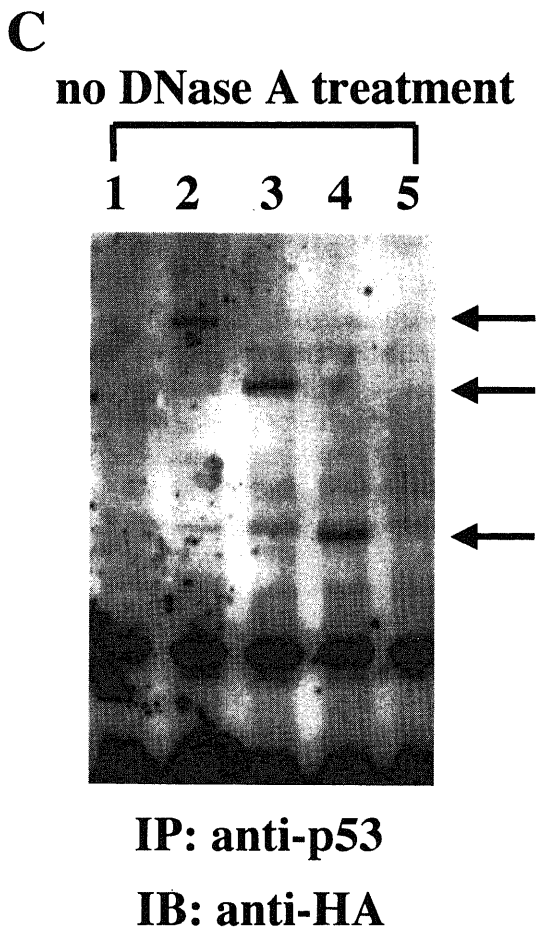


Fig. 3. Mapping of the p53 binding region in ATM. (A) Summary of the mapping of the p53 binding domain in ATM. The full-length and trucated ATM proteins were named by using the number corresponding to the terminal amino acid residues. The binding data were shown on the right. PI-3 kinase and possible p53-binding domains were shown as dotted and closed boxes, respectively. (B) The truncated ATM proteins were translated *in vitro* in the presence of ^{35}S methionine, and were incubated with GST and GST-p53 proteins attached to glutathion-conjugated agarose beads as indicated. After binding, beads were washed and bound protein were analyzed on SDS-PAGE. The arrow indicate the band of ATM proteins. (C) ATM (2139-2840) was translated and labeled with ^{35}S methionine, and then incubate with either GST, GST-p53 (amino acids 1to393, complete length), GST-p53N (amino acids 1to101), GST-p53D (amino acids 102to292) or GST-p53C (amino acids 293to393) as indicated. The arrow indicates the band of ATM protein.







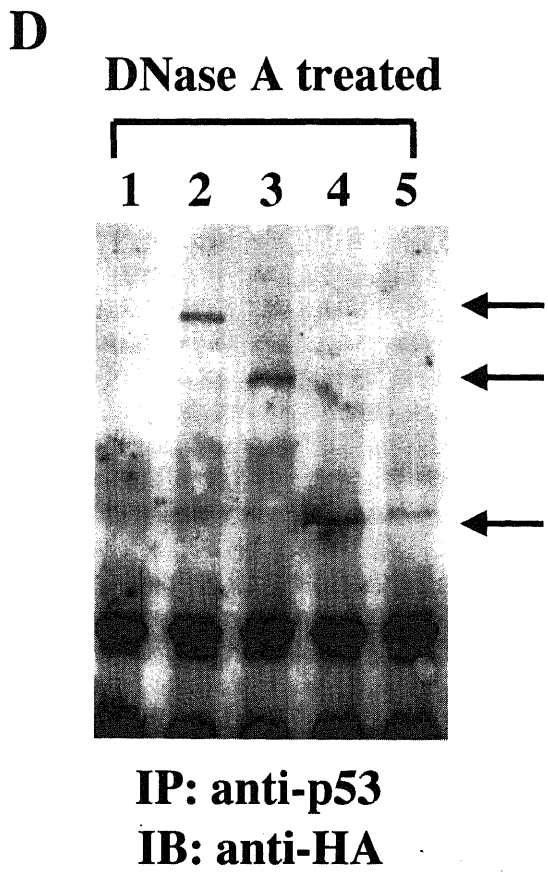


Fig. 4. *In vivo* binding between ATM and p53 is DNA-independent. (A) Diagram of various truncated ATM cDNA cloned in the HA-tagged eukaryotic expression vectors. Black square boxes represent the catalytic PI-3 kinase domains. (B) Expression of transfected plasmids was verified by immunoblotting with HA antibody. lane 1, empty vector; lane2, ATM (1302-3056); lane 3, ATM (1302-2740); lane 4, ATM (2139-3056); lane 5, ATM (2662-3056). (C, D) Cell lysates were treated with (D) or without (C) DNaseA. Cell lysates were then immunoprecipated with p53 antibody and proteins bound to p53 were dectected by immunoblotting analysis with HA antibody. The arrows indicates the band of ATM proteins.

の3つの領域から成る．それぞれのGST-融合タンパク質を作り，ATM (2139-2940) との結合実験を行った．その結果，ATMは中央の配列特異的DNA結合に関与する領域であるコアドメインに結合することが明らかになった (図3C).

Ⅳ．ATMとp53のDNA非依存性結合

細胞内でp53のDNA結合ドメンが，やはりDNAと相互作用するATMのC末端と結合することが明らかになった．そこでATMとp53の結合にDNA依存性があるかどうを検討する必要がある．4つの欠失型ATM，すなわち上述のATM (1302-3056) とATM (2139-3056)，および同様の命名に従ってATM (1302-2704) とATM (2662-3056) を発現ベクターに挿入したもの (図4A) をCOS-7細胞へ導入し，HA抗体を用いてそれぞれ193kDa, 101kDa, 154kDa, 43kDaのバンドを検出した (図4B)．DNase Aで処理した試料としなかった試料について，p53抗体を用いて免疫沈澱をし，沈澱したタンパク質をSDS-PAGEにかけてHA抗体を用いてウエスタンブロットを行うと，両者に全く同じATMタンパク質193kDa, 154kDa, 101kDaのバンドがHA抗体で検出された (図4C, 4D)．この結果より，ATMとp53の結合はDNAに非依存性で，ATMとp53が直接結合することが明らかになった．また2139-2840アミノ酸領域を含まないATMは細胞内でp53と結合しないことがわかった．

考　　察

ATは常染色体劣性遺伝病で，小脳失調，毛細血管拡張，免疫不全，悪性腫瘍の高率の発症，放射線高感受性と放射線抵抗性DNA合成などの特徴を持つ．その病因遺伝子，atmが1995年にShilohらのグループ[14)15)]によりポジショナルクローニングによってクローニングされ，ATの病態がATM遺伝子の異常によりどのように惹起されるのが明らかになりつつある．

9168bpもある巨大で不安定な遺伝子をクローニングするには，適切なベクターと宿主大腸菌,及び至適な培養条件が必要である．今回の実験で，HB101大腸菌株で安定な形質転換増殖を得るにはpEF-BOSベクターを用いて，30℃で培養することが必要であることが明らかになった．ヒトcDNAライブラリーのスクリーニングで得たATMの全長，及び2種類のN末端欠失型のcDNAをN末端にHA標識を付けた形で発現ベクター (pEF-BOS) に組み込んだ．3種類のATM発現ベクターをCOS-7細胞に導入し，その発現をHA抗体またATM抗体を用いたウエスタンブロッティングで確認した．

AT患者由来細胞は紫外線やアルキル化剤には高感受性を示さず，またDNA修復能は正常であるにも関わらず，電離放射線感受性は極めて高く，放射線照射後のp53の誘導が認められないという特徴を持つ[22)23)]．さらに1996年にBarlowら[24)]はATM遺伝子ノックアウトマウスを作製し，ノックアウトマウス由来の線維芽細胞は放射線感受性が高く，また照射後のp53の応答反応が全く検出されず，細胞周期の停止が見られない[25)]ことを報告している．p53タンパク質はG1/Sチェックポイントできわめて重要な役割を果たしており，DNA損傷の発生によりタンパク質レベルでの誘導が起こり，その結果$p21^{SDI1/CIP1/WAF1}$ [26)], GADD45[22)] (growth arrest and DNA damage factor), PCNA[27)] (proliferation cell nuclear antigen), MDM2[28)] (multiple double minute) などの遺伝子の活性化が起こる．p21はサイクリン/サイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase, CDK) 複合体やPCNAと相互作用して細胞周期の進行を阻害する．これに対してMDM2はp53に結合してp53を不活化させ，p53によるG1期停止を解除することにより細胞周期の進行を再開させる．GADD45はPCNAと相互作用してDNA修復を促進する．一方PCNAはp21やGADD45との相互作用により，DNA複製を促進する機能が抑制され，そのDNA修復能が活性化される[29)30)]．AT患者細胞では放射線照射後のp53蓄積が極めて遅れ，細胞周期制御カスケードが有効に機能しない[31)32)]．ATMは，p53の上流で電離放射線に特異的な損傷のシグナルを伝達し，p53活性化とCDK阻害因子タンパク質であるp21の誘導を起こし，G1期阻止にかかわっていることが考えられている．

Wattersら[33)]はATMタンパク質がp53と結合する活性を持ち，細胞内では常時結合状態にあると報告している．本研究においては，ATM cDNA断片のトランスフェクションにより欠失型ATMタンパク質を強制発現し，免疫沈澱法により細胞内にてATMタンパク質がp53と結合することを再確認した．さらに詳しく結合領域を解析するため，試験管内でいくつかの欠失型ATMタンパク質を合成し，GST-p53融合タンパク質との結合実験よりATMのC末端2139番目のアミノ酸から2426番目のアミノ酸までの領域が，p53の配列特異的DNA結合に関与する領域と直接結合することを初めて示した．また，ATMと同じPI-3キナーゼファミリーのDNA-プロテインキナーゼ (PK) はDNAに結合することで活性化されることから，ATMとp53の複合体もDNAに結合する可能性があり，ATMとp53が細胞内で安定なDNA結合複合体として存在するという可能性も考えられた．そこで，DNase A処理をした細胞抽出物とDNase A処理しない細胞抽出物で免疫沈澱法で検討したが両者に差がなかった．この結果より，細胞内でATMとp53はDNAを介さないで直接結合することが考えれる．また，細胞内で形成されたp53-ATM-DNA複合体のDNA部分がDNase A抵抗性になっている可能性も考えられるが，現在のところこれを否定する結果は得られていない．

ATMはT細胞での遺伝子再編成や生殖細胞での遺伝子組み替え，さらにDNA損傷刺激などによって生じたDNA鎖切断の修復過程において，DNA鎖切断の感知もしくはその後の細胞周期のチェックポイントを発動するための情報伝達系の初期過程で機能することが推測される．またATMのC末端側の約350アミノ酸はPI-3キナーゼの触媒ドメインとホモロジーが高く，しかもATP結合及びリン酸化転移に関わると考えられる部位 (2870-2891アミノ酸) はセリンースレオニンキナーゼの高保存領域でもあることから，PI-3キナーゼ，もしくはプロテインキナーゼとして機能すると想像される．Scafmanら[34)]とBaskaranら[35)]のグループは細胞内でATMタンパク質はc-Ablと結合する活性をもち，また放射線によってこの結合が解離，あるいは増加することはないとしている．電離放射線に対する細胞の応答において，ATMはリン酸化を介しc-Ablチロシンキナーゼを活性化し，放射線によって起こるG1期での停止に部分的にかかわっていることを示している．本研究ではATMとp53が直接結合することが示されたので，ATMがp53をリン酸化することによりp53安定化する可能性について検討してみたが，現在のところそれを支持する結果は得られていない (データ未掲載)．一方で約350kDaと巨大なタンパク質であるATMはp53の転写活性化を多種類のタンパク質との相互作用を通して直接に修飾する可能性が高いことが推定される．

結　　論

アフリカミドリザル腎臓上皮由来COS-7細胞株にATの原因遺伝子atmのcDNAを導入し，ATMタンパク質と腫瘍抑制タンパク質p53との結合性及び結合領域を検討し，以下の結論を得た．

1．全長及びN末端欠失型ATMのcDNAを組み込んだ発現ベクターをCOS-7に導入し，ウエスタンブロット法より予想された大きさのタンパク質が発現することを認めた．

2．このATMタンパク質発現細胞を用いて，免疫沈降法より細胞内でATMタンパク質とp53が結合することを示した．また，この結合はDNAを介さないで直接結合することがわかった．

3．この結合はATMのC末端2139番目のアミノ酸から2426番目のアミノ酸までの領域と，p53の配列特異的DNA結合に関与する領域との間で起こることを初めて示した．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導と御校閲をました恩師山本健一教授に深甚なる謝意を表します．本研究に対し終始御助言と御指導を賜りました善岡克次助教授，清水弘子助手，そして孫　先高博士に心から感謝致します．また，電離放射線照射に多大なる御協力を頂きました金沢大学医学部附属病院放射線科高仲　強先生に深くお礼申し上げます．最後に金沢大学がん研究所細胞制御研究部門細胞分子病態研究分野教室各位に深謝いたします．

文　　献

1) Harnden DG. The nature of ataxia-telangiectasia: problems and perspective. Int J Radiat Biol 66: 13-19, 1994

2) Shiloh Y. Ataxia-telangiectasia: closer to unraveling the mystery. Eur J Hum Genet 3: 116-138, 1995

3) Hecht F and BK Hecht. Cancer in ataxia-telangiectasia patients. Cancer Genet Cytogenet 46: 9-19, 1990

4) Swift M, PJ Reitnauer, D Morrell, CL Chase. Breast and other cancers in families affected by ataxia-telangiectasia. N Engl J Med 316: 1289-1294, 1987

5) Swift MP, D Morrell, RB Massey, CL Chase. Incidence of cancer in 161 families affected by Ataxia-Telangiectasia. N Engl J Med 325:1831-1836, 1991

6) Easton DF. Cancer risks in A-T heterozygotes. Int J Radiat Biol 66: s177-182, 1994

7) Taylor AM, Metcalfe JA, Mcconville C. Increased radiosensitivity and the basic defect in ataxia-telangiectasia. Int J Radiat Biol 56: 677-684, 1989

8) Huo YK, Wang Z, Hong JH, Chessa L, McBride WH, Perlman SL, Gatti RA. X-linked agammaglobulinemia, and related syndromes using a modified colony survival assay. Cancer Res 54: 2544-2547, 1994

9) Painter RB & Young BR. Radiosensitivity in ataxia telangiectasia: a new explanation. Proc Natl Acad Sci USA 77: 7315-7317, 1980

10) Meyn Ms. Ataxia telangiectasia and cellular responses to DNA damage. Cancer Res 55: 5991-6001, 1995

11) Barlow C, Brown KD, Deng CX, Tagle DA, Wynshaw-Boris A. Atm selectively regulates distinct p53-dependent cell-cycle check point and apoptotic pathways. Nature genetics 17: 453-456, 1997

12) Kirsch IR. V(D)J recombination and ataxia-telangiectasia: a review. Int J Radiat Biol 66: s97-108, 1994

13) Luo CM, Tang W, Mekeel KL, DeFrank JS, Anne PR, Powell SN. High frequency and error-prone DNA recombination in ataxia telangiectasia cell lines. J Biol Chem 271: 4497-4503, 1996

14) Savitsky K, A Bar-shira, S Gilad, G Rotman, Y Ziv, L Vanagaite, DA Tagle, S Smith, T Uziel, S Sfez, M Ashkenazi, I Becker , M Frydman, R Harnik, SR Patanjali, A Simmons, GA Clines, AMR Taylor, CF Arlett, T Miki, SM Weissman, M Lovect, FS Collins and Y Shiloh. A single ataxia telangiectasia gene with a produt similar to PI-3 kinase. Science 268: 1749-1753, 1995

15) Savitsky K, S Sfez, DA Tagle, A Sartiel, FS Collins, Y Shiloh and G Rotman. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. Hum Mol Genet 4: 2025-2032, 1995

16) Zakian VA. ATM-relate gene: What do they tell us about functions of the human gene? Cell 82: 685-687, 1995

17) Lavin MF, Khanna KK, Beamish H, Spring K, Watters D, Shiloh Y. Relationship of the ataxia telangiectsia protein ATM to phosphoinositide 3-kinase. Trends Biochem Sci 20: 382-383, 1995

18) Jackson SP. Cancer predisposition, Ataxia telangiectasia at the crossroads. Cur Biol 5: 1210-1212, 1995

19) Li L, Lu X, Peterson SA, Leqerski RJ. An interaction between the DNA repair factor XPA and replication protein A appears essential for nucleotide excision repair. Mol Cell Biol15: 5396-5402, 1995

20) Seiichi Mizushima and Shigekazu Nagata. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. Nucleic Acids Research18: 5322, 1990

21) Lopata MA, Cleveland DW, Sollner-Webb B. High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethl sulfoxide or glycerol shock treatment. Nucleic Acids Res 12: 5707-5717, 1984

22) Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. Cell 71: 587-97, 1992

23) Khanna KK, Lavin MF. Ionizing radiation and UV induction of p53 protein by different pathways in ataxia-telangiectasia cells. Oncogene 8: 3307-12, 1993

24) Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, Shiloh Y, Crawley JN, Ried T, Tagle D, Wynshaw-Boris. A ATM-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. Cell 86: 159-71, 1996

25) Xu Y, Baltimore D. Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. Genes Dev 10: 2401-10, 1996

26) W S el-Deiry, T Tokino, V E Velculescu, D B Levy, R Parsons, J M Trent, D Lin, W E Mercer, K W Kinzler, and B Vogelstein WAF1, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression. Cell 75: 817-825,1993

27) Jacqueline M. Gulbis, Zvi Kelman, Jerard Hurwitz, Mike O'Donnell, and John Kuriyan. Structure of the C-Terminal Region of p21WAF1/CIP1 Complexed with Human PCNA. Cell 87: 297-306, 1996

28) Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. Genes Dev 7(7A):1126-32, 1993

29) Levine AJ. P53, the cellular gate keeper for growth and division. Cell 88: 323-331, 1997

30) Li R, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. Subcellular distribution of p21 and PCNA in nomal and repair-deficient cells following DNA damage. Curr Biol 6: 189-199, 1996

31) Beamish H, Willams R, Chen P. Lavin MF. Defect in multiple cell cycle check point in ataxia-telangiectasia postirradiation. J Biol Chem 271: 20486-20493, 1996

32) Zhang N, Song Q, Lu H, Lavin MF. Induction of p53 and increased sensitivity to cisplatin in ataxia-telangiectasia cells. Oncogene 13: 655-659, 1996

33) Watters D, Khanna KK, Beamish H, Birrell G, Spring K, Kedar P, Gatei M, Stenzel D, Hobson K, Kozlov S, Zhang N, Farrell A, Ramsay J, Gatti R, Lavin M. Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. Oncogene 14: 1911-21, 1997

34) Shafman T, Khanna KK, Kedar P, Spring K, Kozlov S, Yen T, Hobson K, Gatei M, Zhang N, Watters D, Egerton M, Shiloh Y, Kharbanda S, Kufe D, Lavin MF. Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. Nature 387: 520-3, 1997

35) Baskaran R, Wood LD, Whitaker LL, Canman CE, Morgan SE, Xu Y, Barlow C, Baltimore D, Wynshaw-Boris A, Kastan MB, Wang JY. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. Nature 387: 516-9, 1997

Analysis of Interactions Between ATM and p53 Proteins

Yingzhu Li, Division of Molecular pathology, Department of Cellular and Molecular Biology, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **108,** 68 — 76 (1999)

Key words ataxia-telangiectasia(AT), AT-mutated (ATM), p53, binding domain, interaction

Abstract

The protein encoded by the ATM gene, mutation of which causes the autosomal recessive hereditary disease ataxia-telangiectasia (AT), belongs to a family of large proteins in the phosphatidylinositol-3 kinase domain that contribute to maintaining genome stability and the cell cycle progression. AT cells have been reported to be hypersensitive to ionizing radiation and defective in the post-irradiational induction of p53 proteins. It is suggested that ATM functions to activate p53, which then induces the CDK inhibitor p21. However, the precise functions of ATM are still unclear. In this study, we cloned full-length and truncated ATM cDNAs into an eukaryotic expression vector and examined the possible interaction between ATM and p53. The HA epitope added to the amino-termini of the ATM proteins allowed specific detection of the transfected ATM by immunoblotting and immunoprecipitation. The full-length and truncated ATM proteins were transiently expressed in COS-7 cells, The expression of different ATM proteins were confirmed by western blotting analysis using both HA and ATM antibodies. To investigate the possibility that ATM might interact with p53, cell extracts were immunoprecipitated with either p53 or HA antibodies, and the immunoprecipitates were then analyzed by immunoblotting using HA and p53 antibodies, respectively. Cell extracts treated with DNase A were also analyzed as above. The results indicated that the ATM protein binds to p53 *in vivo*, and this association is not mediated through DNA. Analysis of GST-p53 binding to various regions of ATM translated in vitro suggested that the core specific DNA-binding region of p53 interacts with a region of the ATM from amino acid residues 2139 to 2426.