

MORC3 による p53 の PML body への局在化と 細胞老化の制御

高橋 桂子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞増殖学 (大阪府立成人病センター) 講座
(竹家 達夫 教授)

平成 19 年 2 月 12 日提出

所属 (主指導教員)	細胞増殖学講座 (成人病センター) (竹家 達夫)		
氏名	高橋 桂子	提出	平成 18 年 12 月 25 日
題目	MORC3 による p53 の PML body への局在化と細胞老化の制御		
要旨 細胞質にミトコンドリアや小胞体などのオルガネラが存在するように、核内にもいくつかの機能ドメインが存在し、蛋白やDNAがそれぞれに正しく配置されている。このような機能ドメインの一つとして知られるPML (<u>P</u>romyelocytic <u>l</u>eukemia) bodyには、シグナルに応じて様々な転写調節因子が集合することが知られている。例えば、転写因子p53は、ストレスシグナルに応じてPML bodyへと局在化し活性化して、細胞周期の停止やアポトーシス、細胞老化を誘導する。本研究では、GHL (<u>G</u>yrase B, <u>H</u>sp90, <u>M</u>utL) ATPase family蛋白、MORC3 (<u>M</u>icr<u>o</u>rchidia3) がp53のPML bodyへの局在化を制御し、細胞老化の誘導に関与していることを明らかにした。 1) MORC3 の高発現は細胞老化を誘導する ヒト正常繊維芽細胞に MORC3 を高発現させたところ、著しい増殖の抑制が見られた。その際、細胞が扁平になり巨大化するという細胞老化特異的な形態変化が見られたことから、細胞老化のマーカーである SA-β-gal (<u>S</u>enescence associated-β-galactosidase) 活性を調べたところ、陽性を示す細胞が顕著に増加していた。また細胞老化に特異的な p16 の発現上昇も見られたことから、MORC3 の発現が細胞老化を誘導することが示された。細胞老化は癌化に対する防御メカニズムの一つで、活性型 Ras などの癌化シグナルにより誘導されることが知られており、そのシグナル経路における鍵分子の一つとして転写因子 p53 が挙げられる。そこで、p53-/-の MEF (<u>M</u>ouse <u>e</u>mbryonic <u>f</u>ibroblast) を用いて、MORC3 による細胞老化への影響を調べた。その結果、Wt (<u>W</u>ild <u>t</u>ype) の MEF では、ヒトの場合と同様に細胞の増殖抑制や形態変化が観察されたが、p53-/-の MEF では確認されなかった。このことは、少なくともマウスにおいて、MORC3 が p53 依存的に細胞老化を誘導することを示唆している。 2) MORC3 は p53 の転写活性を制御する			

p53 の転写活性における MORC3 の影響を調べるため、p53 結合領域を含むレポーターベクターを用いたルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、MORC3 の発現により内在性 p53 の転写活性が上昇していることがわかった。一方、MORC3 の ATPase 不活性化 mutant ではこのような上昇は見られないことから、MORC3 が ATPase 活性依存的に p53 の転写活性を制御していることが示唆された。Wt の MEF を adriamycin で処理し DNA 損傷を与えると、p53 のリン酸化やアセチル化が促進され活性化されて、下流遺伝子 p21 の発現が誘導される。しかし、興味深いことに、*MORC3*^{-/-} の MEF では Wt と同様に p53 がリン酸化やアセチル化され安定化されていたにもかかわらず、p21 の発現上昇が抑制されていることがわかった。これまでに、p53 の転写活性は翻訳後修飾だけでなく、PML body への局在化によっても制御されることが報告されており、MORC3 が p53 の PML body への局在化に参与していることが推察された。そこでこの仮説を検証するため、始めに MORC3 の局在を調べた。

3) MORC3 は ATPase 活性依存的に PML body に局在する

免疫染色の結果、MORC3 は、恒常的に PML body に局在することが知られている PML や Sp100 と共局在することがわかった。一方、p53 を活性化しない ATPase 不活性化 mutant は核全体に拡散して存在していた。また、細胞内から ATP を枯渇させた場合にも、MORC3 は核内に拡散した。以上の結果は、MORC3 の局在が自身の ATPase 活性依存的に制御されていることを示唆しており、MORC3 の局在が p53 の転写活性を制御することが予測された。

4) MORC3 は p53 や Sp100 の PML body への局在化を制御する

p53 の局在における MORC3 の影響を検討するため、細胞に MORC3 を高発現させたところ、通常は核全体に存在する p53 が PML body に集積していた。このことは MORC3 が p53 の局在を制御している可能性を示唆する。そこで、shRNA を用いて MORC3 をノックダウンし、p53 の局在を調べた。adriamycin により DNA 損傷を与えると p53 が PML body に集積するが、MORC3 をノックダウンした細胞では、このような集積は見られなかった。さらに、MORC3 非存在下では、恒常的に PML body に局在することが知られる Sp100 も核内で拡散していることがわかった。これらの結果は、MORC3 が p53 や Sp100 の PML body への局在化を制御していることを示唆する。

本研究は、脂質膜を持たない核内ドメインへの蛋白の局在化メカニズムに関する初めての報告であり、シグナル応答における PML body を介した転写制御メカニズムの解明に貢献できるものと考えられる。

目次

序章	5
第1章 MORC3 による細胞老化の誘導	8
1-1 材料と方法	10
1-2 結果	11
1-3 考察	16
第2章 MORC3 による p53 の活性制御	18
2-1 材料と方法	20
2-2 結果	21
2-3 考察	28
第3章 MORC3 の細胞内局在	30
3-1 材料と方法	31
3-2 結果	33
3-3 考察	39
第4章 MORC3 による p53 及び Sp100 の局在制御	41
4-1 材料と方法	43
4-2 結果	45
4-3 考察	51
終章	53
謝辞	55
参考文献	56

序章

本研究では、GHL (Gyrase B, Hsp90, MutL) ATPaseファミリータンパクの一つ、MORC3 (microrchidia3) について解析を行った。MORCファミリータンパクはゼブラフィッシュを始め、線虫、シロイヌナズナなど、多くの高等生物に存在し、マウスでは5つ (Morc1, Morc2a, Morc2b, Morc3, Morc4)、ヒトでは4つのホモログ (MORC1、MORC2、MORC3、MORC4) が存在する (Inoue et al., 1999)。

これらのファミリータンパクのなかで最も解析が進んでいるのはマウスMorc1であり、ヒトMORC1と同様に精巣特異的に発現する。Morc1は精子形成に異常のあるマウスからポジショナルクローニングされた遺伝子である (Inoue et al., 1999; Watson et al., 1998)。正常な生殖細胞では、第一減数分裂前期のパキテン期に、相同染色体の対合を安定に保持するため、シナプトネマ構造と呼ばれる複合体が形成される。しかし、Morc1を欠損した生殖細胞ではこの複合体が形成されず、減数分裂が停止し、アポトーシスが起きる。さらに、生後6ヶ月を経過したMorc1欠損マウスの精巣では、精子形成において幹細胞の役割を果たす精原細胞も存在せず、支持細胞のみが観察される。そのため、Morc1は減数分裂、あるいは精原細胞の維持に関与する分子であると考えられているが、現在までのところ、その分子メカニズムは不明である。

MORC2、MORC3 及び MORC4 は、MORC1 とそれぞれ 34、24、23%の相同性を有し、MORC2、MORC3 はほぼ全組織で、MORC4 は胎盤で強く発現が見られる。このことは MORC ファミリータンパクが、生殖細胞に限らず、様々な細胞で分化、増殖機構に関与する可能性を示唆している。これまでに MORC2 及び MORC4 の機能に関する報告はなく、MORC3 に関しても、核マトリックス (核内で転写や複製に関与する複合体や染色体を一定の場所に維持するための足場) に存在するタンパクとしての報告があるが (Kimura et al., 2002)、その機能は明らかにされていなかった。

本研究では、MORC3 が転写因子 p53 の細胞内局在を制御し活性を調節するとともに、細胞老化の誘導にも関与していることを明らかにした。第1章ではMORC3がp53依存的に細胞老化を誘導することを示し、第2章ではMORC3がp53の活性を調節することを明らかにした。また第3章ではMORC3自身の細胞内局在について検討し、第4章ではMORC3によるp53の局在制御について述べた。

MORC ファミリータンパクは4つのドメイン、アミノ末端側の GHL ATPase ドメイン (I; N box、II; G1 box、III; G2 box、IV; G3 box) (Dutta and Inouye, 2000)、nuclear localization signal (NLS; 橙色)、zinc finger 様の CW ドメイン (赤色) (Perry and Zhao, 2003)、カルボキシル末端側の Coiled-coil ドメイン (緑色) から構成されており、MORC2 にのみもう1つのドメイン、Proline-rich ドメイン (水色) が存在する (Figure 1)。MORC ファミリータンパクにおける相同性はアミノ末端側の領域 (青色)、つまり ATPase ドメインのある領域で高く、MORC1 に対して、MORC2 では 49%、MORC3

では 33%、MORC4 では 35%であった。

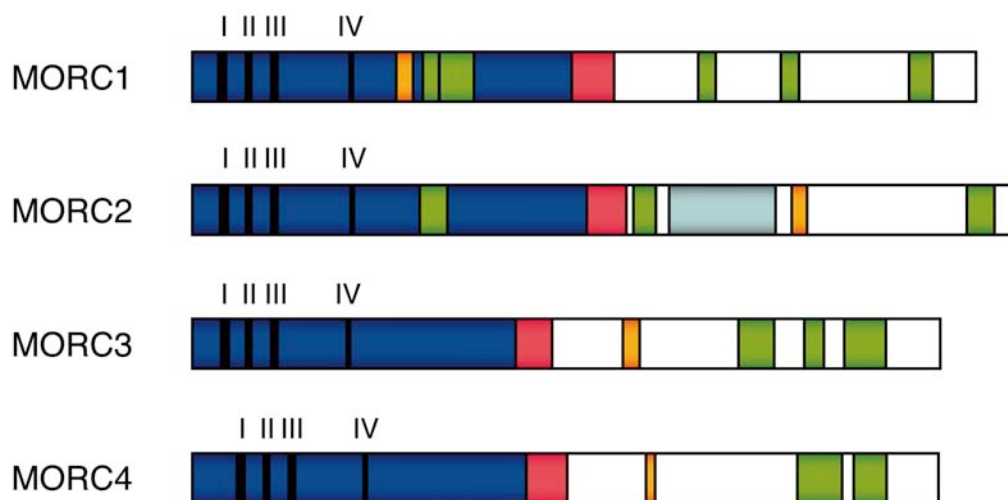


Figure 1 MORC ファミリータンパクの構造

そこで MORC ファミリータンパクの機能を理解する上で、ATPase ドメインの役割を検討することが重要であると考え、第 2 章以降では MORC3 の ATPase 不活性化 mutant を作製し、解析を行った。GHL ATPase ドメインは、DNA topoisomerase II である Gyrase B、molecular chaperone として知られる Hsp90、DNA-mismatch repair protein である MutL などに共通してみられる ATP 結合ドメインである。これらのタンパクと MORC ファミリータンパクのアミノ酸を比較したところ、MORC ファミリータンパクにも 4 つのコンセンサスモチーフ (N box、G1 box、G2 box、G3 box) が保存されていることがわかった (Figure 2)。また、Gyrase B や Hsp90、MutL では結晶解析が既に行われており、ATP 結合時の形態が詳細に研究されている (Ban et al., 1999; Panaretou et al., 1998)。それによれば、ATP の γ 位のリン酸結合を切断する触媒部位は、N box に存在するグルタミン酸残基であり、MORC ファミリータンパクにも保存されていた。そこで本研究では、このグルタミン酸残基をアラニン残基に変換した ATPase 不活性化 mutant、MORC3-E35A を作製し、p53 の細胞内局在と活性の制御における ATPase ドメインの重要性についても検討を行った。

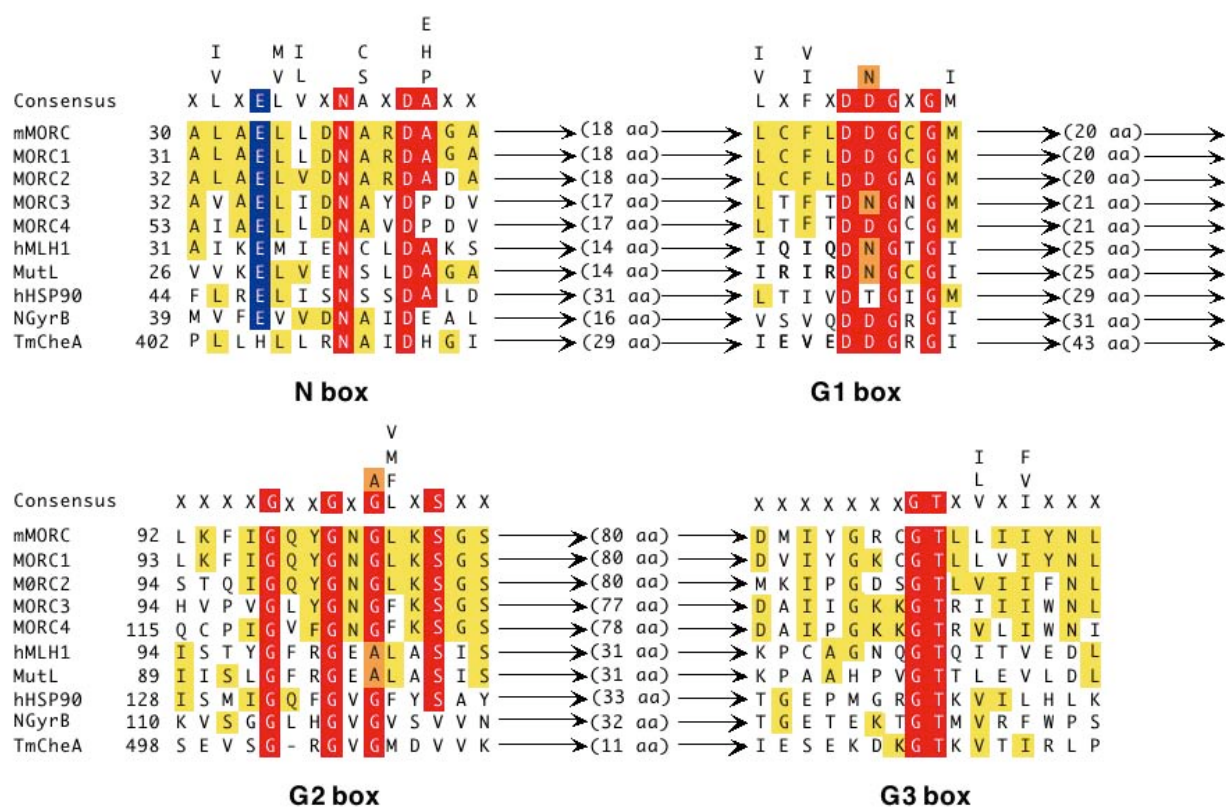


Figure 2 GHF ATPase ファミリータンパクのアライメント

第 1 章 MORC3 による細胞老化の誘導

ヒトの正常体細胞を培養し続けると、一定期間増殖するものの、やがて細胞が大きく扁平な形状を示すようになり、増殖が不可逆的に停止することが知られている (Hayflick and Moorhead, 1961)。この現象は細胞老化と呼ばれ、ヒトだけでなく脊椎動物全般で観察される。老化した細胞では、形態変化に加えて、senescence associated- β -galactosidase (SA- β -gal) 活性と呼ばれる酸性条件下での β -galactosidase 活性が高いことや (Dimri et al., 1995)、cyclin-dependent kinase (CDK) インヒビター p16 の発現が上昇していること (Alcorta et al., 1996)、senescence-associated heterochromatic foci (SAHF) と呼ばれるヘテロクロマチン構造が形成されることなど (Narita et al., 2003)、いくつかの特徴的な現象が観察され、可逆的な増殖停止状態である G0 期の細胞とは区別される。

このような細胞分裂の繰り返しによる老化の原因の一つとして、テロメアの短縮が挙げられる。ヒトの正常体細胞ではテロメラーゼ活性が極めて低く、染色体の複製に伴うテロメアの短縮を補うことができないため、分裂回数が一定数を超えるとテロメア末端の構造に不具合が生じて老化が誘導される (Itahana et al., 2004)。しかし、テロメラーゼ活性の高いマウスの体細胞においても、細胞分裂を繰り返すことによって、十分なテロメア長を保ったまま細胞老化が誘導される。このことはテロメアの短縮以外にも細胞老化を誘導する機構が存在することを意味しており、マウス胎児由来繊維芽細胞 (MEF) を低酸素条件下で培養すると著しく分裂寿命が延びることから、マウスにおける細胞老化の原因は、培養に伴う酸化ストレスであると考えられている (Parrinello et al., 2003)。

近年の研究により、このようなテロメアの短縮を伴わない細胞老化は、長期間の培養を経ることなく、様々な刺激によって急速に引き起こされることが明らかになってきた (Serrano and Blasco, 2001)。活性酸素への暴露、X 線や DNA 損傷剤によるゲノム損傷、癌化シグナルである活性型 RAS の高発現、p16 の高発現、前骨髄球性白血病の原因遺伝子 (PML promyelocytic leukemia) IV の高発現などがその例として挙げられる。本章では、GHL ATPase ファミリー蛋白 MORC3 の高発現によっても細胞老化が誘導されることを明らかにした。

細胞老化が癌化シグナルによって誘導されること、また癌細胞のほとんどが不死化していることなどから、細胞老化は癌抑制機構の一つであると考えられてきた。実際に最近では、マウスモデルやヒトの臨床サンプルを用いて、発癌初期における SA- β -gal 活性の上昇や p16 の発現上昇などが確認され、細胞老化が生体内で癌抑制機構として働いていることが報告されている (Braig et al., 2005; Collado et al., 2005)。

また癌抑制遺伝子である p53 や p16 が細胞老化の誘導と維持において中心的な役割を担っていることから細胞老化と癌抑制の関連が示唆されてきた (Campisi,

2005)。転写因子 p53 は DNA 損傷や増殖因子の枯渇、癌遺伝子の異常発現など様々なストレスに応答し、下流遺伝子の発現を制御することで、アポトーシスや細胞周期の停止、DNA 修復などを誘導することが知られている。細胞老化の誘導においてもその役割は重要で、テロメアの短縮によるゲノムの不安定化や、DNA 損傷は p53 に伝えられ、標的タンパク質である CDK インヒビター p21 の発現が上昇することで Rb が活性化される (p53 経路)。また活性型 RAS の高発現は reactive oxygen species (ROS) の発生、mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードの活性化、ゲノム複製の異常による DNA 損傷などを介して p53 だけでなく p16 にも作用し (Rb 経路)、Rb の活性化を誘導することが知られている。p16 もまた、ヒトの多くの癌組織で遺伝子欠失や点突然変異、プロモーター領域のメチル化によってその発現が失われている癌抑制遺伝子である。

Rb の活性化が十分に進むと、その後 p16 や Rb、p53 の機能を阻害しても老化した細胞は増殖を開始しないことが報告されており (Beausejour et al., 2003)、このような増殖停止状態の維持には細胞老化特異的なヘテロクロマチン構造 SAHF によるエピジェネティックな制御が関与しているのではないかと考えられている。

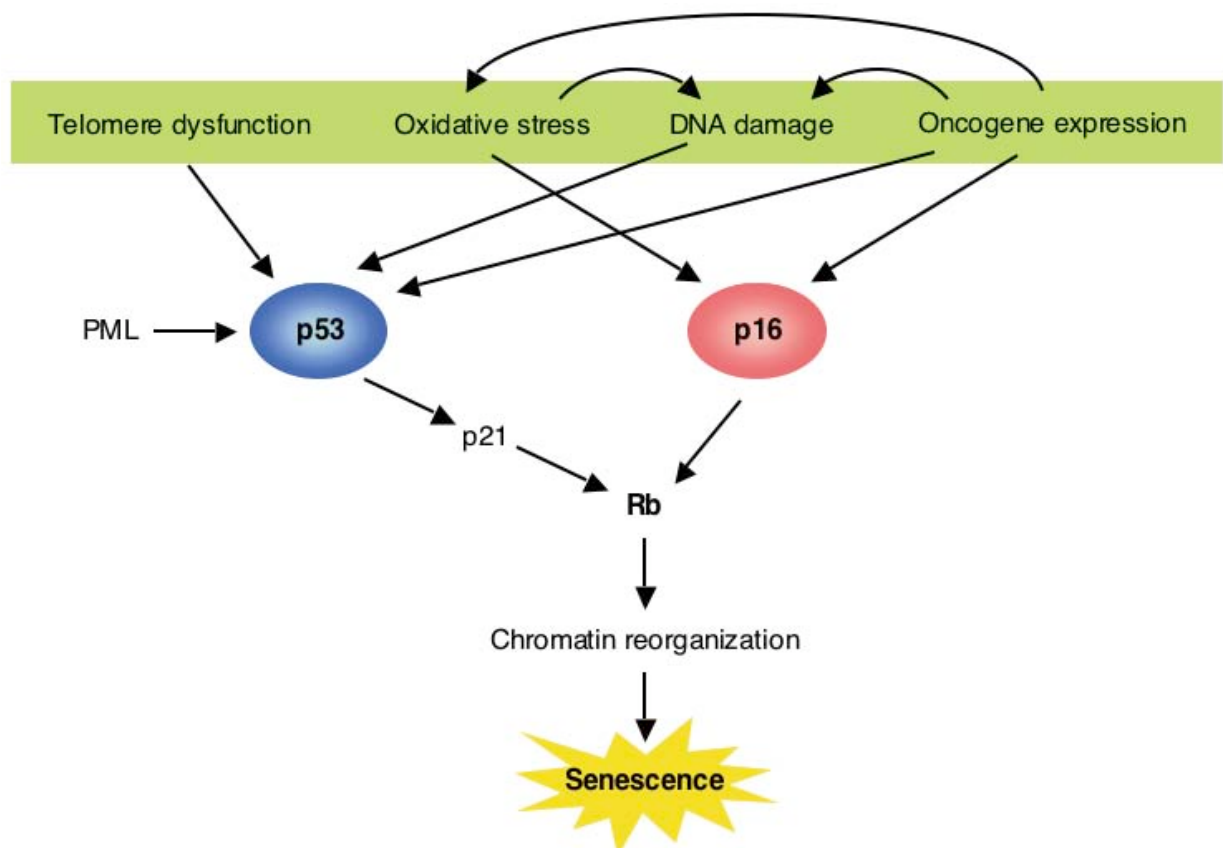


Figure 1-1 細胞老化の誘導経路

様々な刺激に対して p53 経路と Rb 経路がどのように使い分けられているのか、また細胞老化の誘導と維持にどちらの経路がどの程度寄与しているかなど未だに明らかでない部分も多くある。しかし、p53 経路と Rb 経路のどちらか、あるいは両方を遮断することで細胞老化を抑制できることから、細胞老化の誘導と維持がこれら 2 つの経路に依存しているのは間違いなさそうである。本章では MORC3 によって誘導される細胞老化が少なくともマウスにおいて p53 依存的であることを示し、MORC3 が p53 の活性に関与する可能性を示した。

1-1 材料と方法

1-1-1 細胞培養

ヒト胎児肺由来繊維芽細胞株 WI-38 (RIKEN cell bank) は minimum essential medium (MEM, Invitrogen)、mouse embryonic fibroblast (MEF)、レトロウイルスの産生用パッケージング細胞株 Plat-A、及び Plat-E は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) を用いて 37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。培地には 10% (v/v) 非働化 fetal bovine serum (FBS, Gibco)、100U/ml penicillin G potassium (明治)、100μg/ml streptomycin sulfate (明治)を添加した。MEF の培養には 0.1% gelatin (Sigma) でコートしたディッシュを使用した。細胞の回収には、trypsin-EDTA (Nacalai tesque) を用いた。

1-1-2 プラスミドの作製

レトロウイルスベクター pLNCX2-EGFP-MORC3-I-P は pME-EGFP-MORC3-I-P (2-1-2 を参照)に由来する EGFP-MORC3-internal ribosomal entry site-puromycin resistance gene (I-P) フラグメントを pLNCX2 vector (Takara Bio) の EcoRI と NotI の間に組み込み作製した。pLNCX2-EGFP-I-P と pLNCX2-EGFP-PML IV-I-P は pLNCX2-EGFP-MORC3-I-P の FLAG-MORC3 フラグメントと MORC3 フラグメントをそれぞれ pEGFP vector (Takara Bio) 由来の EGFP フラグメントまたは human PML IV フラグメントで置換し作製された。

シーケンスと制限酵素処理によって作製した全てのプラスミドの構造が正しいことを確認した。

1-1-3 レトロウイルスによる遺伝子導入

レトロウイルスの産生にはパッケージング細胞、Plat-A または Plat-E を用い、条件は Morita らの方法 (Morita et al., 2000) に従った。感染、puromycin による選択、細胞数の計測は Figure 1-2 のようなスケジュールで行った。細胞数の計測は、day -1 に細胞を 15 well に播き、particle counter Z1 (Beckman Coulter)を用いて day 0 とその後

3 日毎に 3 well ずつ行った。細胞はセミコンフルエントになった時点で 4 倍希釈し培養を続けた。population doubling は以下の式により算出した。

$$\begin{aligned} \text{population doublings} &= \{\log_{10}(\text{培養後の細胞数} / \text{day 0 における細胞数})\} / \log_{10}2 \\ &= \{\log_{10}(\text{培養後の細胞数} / \text{day 0 における細胞数})\} \times 3.32 \end{aligned}$$

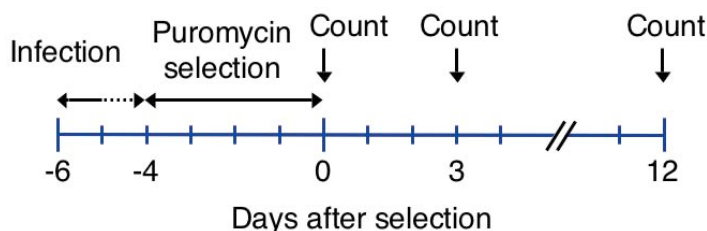


Figure 1-2 感染スケジュール

感染は 1 日または 2 日間行い、1 日である場合はもう 1 日通常の培地で培養した。その後、WI-38 cell は 2 μ g/ml、MEF は 3 μ g/ml で 4 日間 puromycin による選択を行い、選択終了日を day 0 とした。

1-1-4 SA- β -gal アッセイ

細胞を 3% paraformaldehyde (PFA)/phosphate-buffered saline (PBS) [8.10mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 2.68mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄] で 5 分間固定した後、SA- β -gal stain solution [40mM citric acid, Na₂HPO₄ (pH6.0), 5mM potassium ferrocyanide, 5mM potassium ferricyanide, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, 1mg/ml X-gal] を加え、37°C で 16 時間培養した。核の染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Wako) を用いた。

1-1-5 ウェスタンブロット

タンパクは SDS-PAGE により分離した後、Hybond-P (GE Healthcare)、あるいは Immobilon-P (Millipore) に転写し、0.2% casein (Wako) / TBS-T [50mM Tris-HCl (pH7.4), 150mM NaCl, 0.1% Tween20] でブロッキングして、rabbit polyclonal anti-MORC3、mouse monoclonal anti-p16 (DSC-50; Sigma) または mouse monoclonal anti- β -tubulin (TUB 2.1; Sigma) と反応させた。その後、peroxidase-conjugated sheep anti-rabbit IgG (Sigma) または peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG (Sigma) と反応させ、ECL または ECL plus western blotting detection reagents (GE Healthcare)を用いて検出した。

1-2 結果

1-2-1 MORC3 の高発現は細胞増殖を抑制する

MORC3 の機能を調べるため、ヒト胎児肺由来繊維芽細胞 WI-38 cell にレトロウイルスを用いて EGFP-MORC3 を高発現させた (Figure 1-3)。その結果、MORC3 の高発現は、既に細胞老化を誘導することが知られている PML IV と同程度まで細胞の増殖を抑制することがわかった (Figure 1-4)。また、その際、細胞が扁平になり巨大化するなどの細胞老化に特異的な形態変化が観察された。

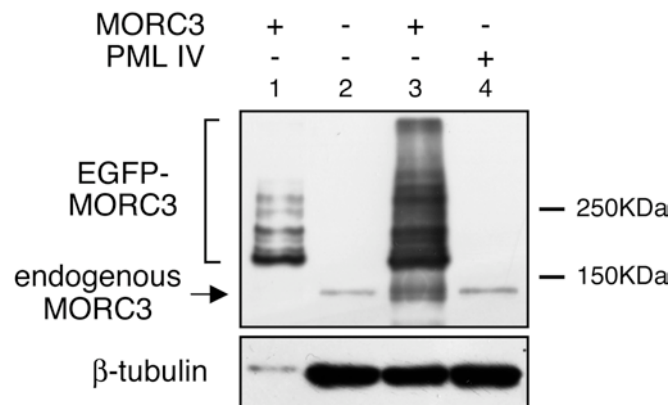


Figure 1-3 レトロウイルスによるMORC3の高発現

WI-38 cell にレトロウイルスベクター pLNCX2-EGFP-I-P (lane 2)、pLNCX2-EGFP-MORC3-I-P (lane 1, 3)、pLNCX2-EGFP-PML IV-I-P (lane 4)を用いて、それぞれを高発現させ puromycin で 4 日間選択後、MORC3 の発現量を調べた。lane 1 は lane 3 の 1/10 量を泳動した。

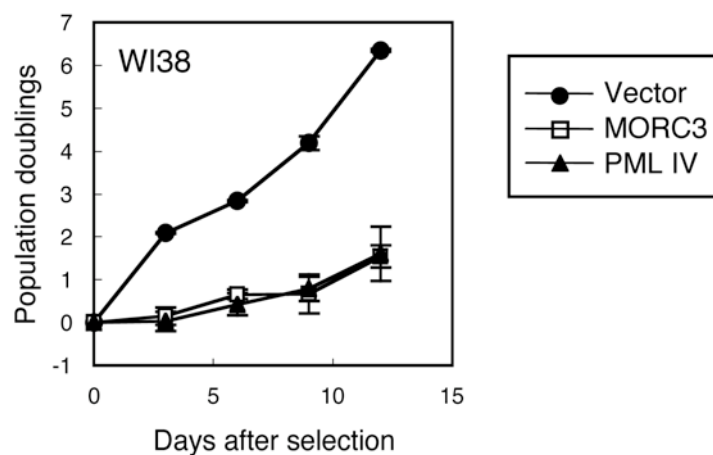


Figure 1-4 細胞増殖におけるMORC3の影響

レトロウイルスを用いて、EGFP (●)、EGFP-MORC3 (□)、EGFP-PML IV (▲) をそれぞれ発現させた WI-38 cell を day -1 に 4×10^4 cell/dish で 6 well plate にまき、day 0、3、6、9、12 に細胞数を数えた。実験はトリプリケートで行い、その平均値と標準偏差を示した。day 0 は puromycin による選択が終了した日を示す。

1-2-2 MORC3 は細胞老化を誘導する

MORC3 の高発現により細胞老化が誘導されているかを明らかにするため、puromycin による選択後 6 日経過した細胞を用いて、細胞老化のマーカーである SA- β -gal 活性を調べた。その結果、EGFP のみを発現した細胞のうち陽性を示す細胞が $2.3 \pm 0.8\%$ であったのに対し、MORC3 を高発現した細胞では $51.0 \pm 5.1\%$ 、PML IV を高発現した細胞では $47.1 \pm 1.2\%$ と顕著に増加していたことから、MORC3 が PML IV と同様に細胞老化を誘導していることがわかった (Figure 1-5, 6)。また、MORC3 を高発現した細胞では、老化した細胞で特異的に発現することが知られている CDK インヒビター、p16 の発現上昇も確認された (Figure 1-7)。

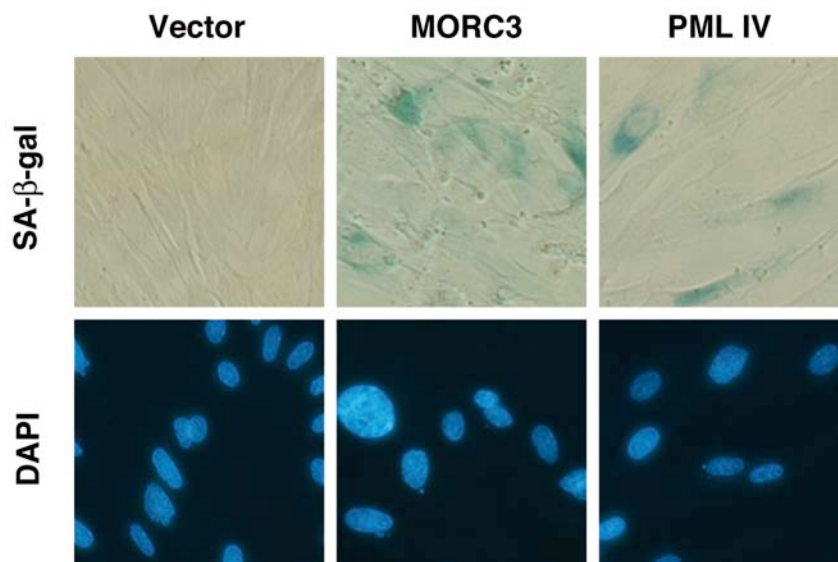


Figure 1-5 MORC3発現細胞のSA- β -gal染色像

レトロウイルスを用いて、EGFP (左)、EGFP-MORC3 (中央)、EGFP-PML IV (右) をそれぞれ発現させた WI-38 cell の day 6 における SA- β -gal 染色の結果を示した。陽性の細胞は青色を呈している (上図)。また核を DAPI で染色した (下図)。

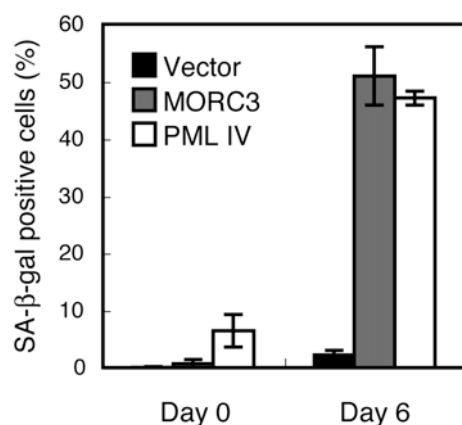


Figure 1-6 MORC3の発現とSA-β-gal陽性細胞の割合

Figure 1-5において200個以上の細胞を観察し、SA-β-gal陽性細胞の割合を算出した。実験はトリプリケートで行い、その平均値と標準偏差を示した。

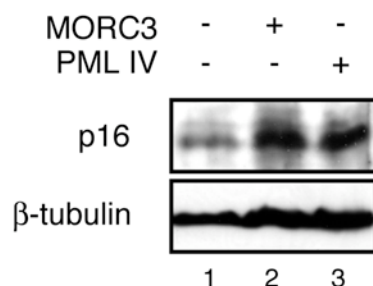


Figure 1-7 MORC3発現細胞におけるp16の発現

WI-38 cellにレトロウイルスを用いて、EGFP (lane 1)、EGFP-MORC3 (lane 2)、EGFP-PML IV (lane 3) をそれぞれ発現させた。day 6に細胞を回収し、抗p16抗体、あるいは抗β-tubulin抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

1-2-3 MORC3 による細胞老化は p53 依存的である

MORC3 の高発現による細胞老化の誘導に p53 が関与しているかを調べるため、p53 ノックアウトマウス由来の MEF にレトロウイルスを用いて MORC3 を高発現させた。その際、wild type (Wt) の MEF と p53^{-/-} MEF で EGFP-MORC3 の発現量に著しい差は見られなかった (Figure 1-8)。MORC3 の高発現により、Wt の MEF は WI-38 cell で観察されたような細胞老化特異的な形態変化を示したが、p53^{-/-} MEF では著しい形態変化は観察されなかった (Figure 1-9)。またこれらの細胞増殖を調べたところ、Wt の MEF では MORC3 の高発現により増殖が抑制されたが、p53^{-/-} MEF では、著

しい増殖抑制は確認されなかった。このことは、少なくともマウスにおいて、MORC3 が p53 依存的に細胞老化を誘導することを示唆している (Figure 1-10)。

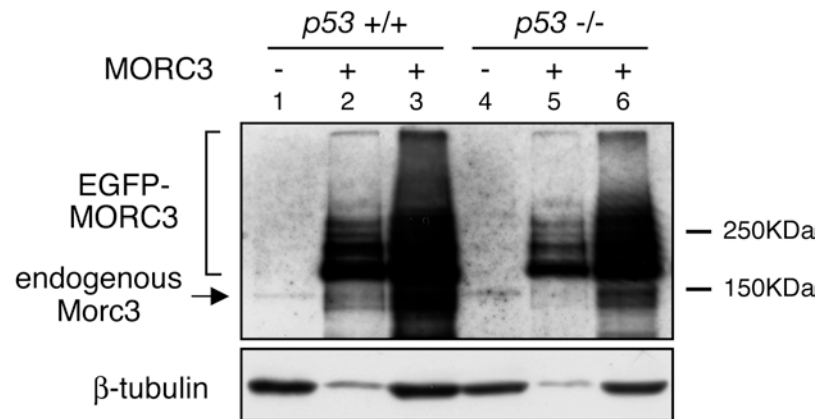


Figure 1-8 *p53*^{-/-} MEFにおけるMORC3の高発現

p53^{+/+} (lane 1, 2, 3)、あるいは *p53*^{-/-} (lane 4, 5, 6) MEF に、レトロウイルスベクター pLNCX2-EGFP-I-P (lane 1, 4)、または pLNCX2-EGFP-MORC3-I-P (lane 2, 3, 5, 6) を用いてそれぞれを高発現させ、puromycin で 4 日間選択後、MORC3 の発現量を調べた。lane 2 と 5 はそれぞれ lane 3 と 6 の 1/10 量を泳動した。*p53*^{+/+} と *p53*^{-/-} MEF は littermate から調整した。

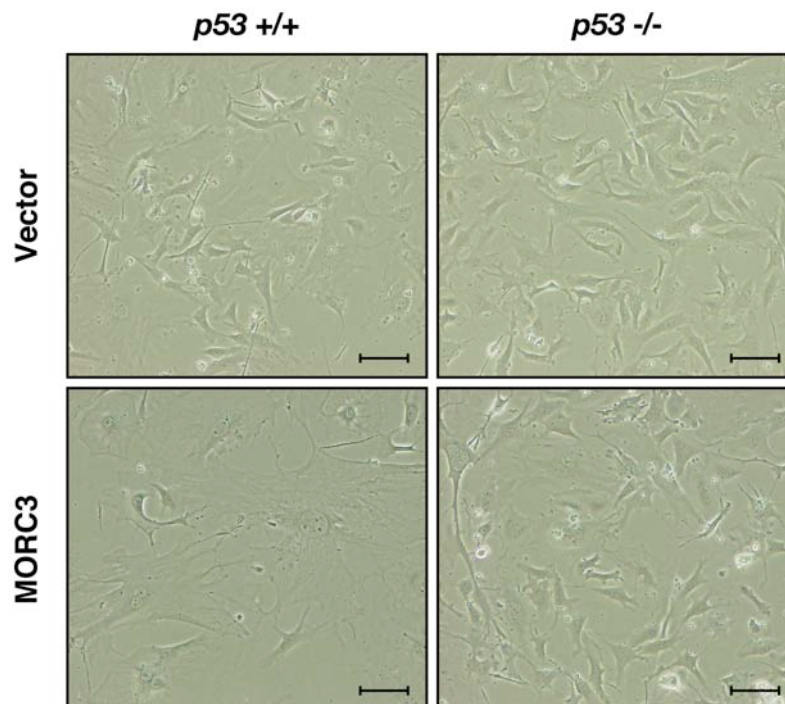


Figure 1-9 MORC3による細胞の形態変化

レトロウイルスを用いて EGFP または EGFP-MORC3 を発現させた *p53*^{+/+}あるいは *p53*^{-/-} MEF の day 3 における位相差観察像を示した。*p53*^{+/+}と *p53*^{-/-} MEF は littermate から調整した。スケールバーは 100 μ m を示している。

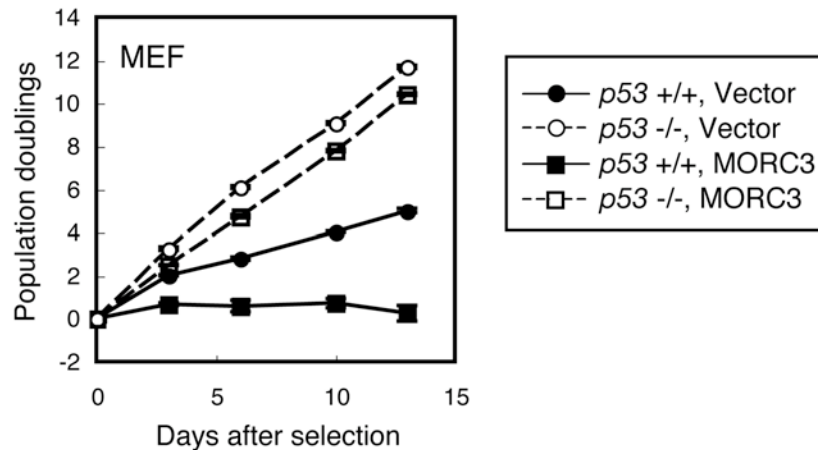


Figure 1-10 *p53*^{-/-} MEFの増殖におけるMORC3の影響

レトロウイルスを用いて、EGFP (●、○)または EGFP-MORC3 (■、□)を発現させた *p53*^{+/+} (●、■)または *p53*^{-/-} (○、□) MEF を day -1 に 2X10⁴ cell/dish で 12well plate にまき、day 0、3、6、9、12 に細胞数を数えた。実験はトリプリケートで行い、その平均値と標準偏差を示した。day 0 は puromycin による選択が終了した日を示す。

1-3 考察

本章では、ヒト及びマウスの正常細胞に MORC3 を高発現させることにより、細胞老化が誘導されることを明らかにした (Figure 1-4, 5, 6, 7, 9, 10)。このことから MORC3 の高発現が活性型 RAS の高発現や DNA 損傷のように発癌ストレスである可能性や、癌抑制遺伝子 p16 の高発現のように細胞老化の誘導シグナルを模倣している可能性が考えられる。

また本章では、少なくともマウスにおいて MORC3 が p53 依存的に細胞老化を誘導することを明らかにした (Figure 1-9, 10)。このことは MORC3 が p53 の活性を制御している可能性を示唆しており、次章以降において詳細な検討を行った。

本章の冒頭に述べたように、細胞老化の誘導には p53 経路と Rb 経路の 2 つ経路が関与しているが、ノックアウトマウスの解析から、マウスにおいては Rb 経路の重要性が低いことが指摘されている (Sharpless et al., 2001)。p53 ノックアウトマウス由来の MEF が不死化しており、活性型 RAS の高発現により癌化するのに対し、p16 ノッ

クアウトマウス由来の MEF は Wt と同様に細胞老化を起こす。また p53 ノックアウトマウスが若年から高頻度で発癌するのに対し、p16 のノックアウトマウスでは著しい癌の自然発生は確認されないことから、細胞老化における Rb 経路の関与は低いと考えられている。

これらの観点から、MORC3 を高発現した *p53*^{-/-} MEF で増殖が確認されたことは、ヒトにおいても MORC3 による細胞老化の誘導が p53 経路のみに依存していることを示すものではない。実際に MORC3 の高発現により p16 の発現上昇も確認されたことから (Figure1-7)、少なくとも WI-38 cell においては p53 経路と Rb 経路の両方を介して MORC3 によるシグナルが伝わっていることが予想される。

ヒトにおいては、p53 経路と Rb 経路どちらかを阻害することで細胞の分裂寿命が延長することから、細胞老化におけるこれら 2 つの経路の重要性が示されているが、実際にどちらの経路がどの程度寄与しているかについては、細胞種によって異なることもあり未だ議論の余地がある。p16 の発現は転写因子 Ets1/2 や (Ohtani et al., 2001) ポリコームグループタンパク Bmi-1 (Jacobs et al., 1999) などによって制御されていることが報告されており、MORC3 がどのようなメカニズムで p16 の発現を誘導しているかを明らかにするには、これらを検討する必要がある。

第2章 MORC3 による p53 の活性制御

転写因子をコードする *p53* 遺伝子は 50%以上の悪性腫瘍で変異が確認される癌抑制遺伝子である。DNA 損傷や増殖因子の枯渇、ウイルス感染、癌遺伝子の異常発現など様々なストレスに応答し、アポトーシスや細胞周期の停止、DNA 修復、細胞老化などに関する遺伝子の発現を制御することが知られている (el-Deiry, 1998)。p53 の代表的な下流遺伝子としては *p21*、*Bax* (*Bcl-2-associated X protein*)、*MDM2* (*murine double minute 2*) などが挙げられる。p21 は G1 期特異的なサイクリン/CDK 複合体に結合し、その機能を阻害することで細胞周期停止に関与し、Bcl-2 ファミリータンパクである Bax はミトコンドリアからのチトクローム C の放出を促進することによってアポトーシスを誘導する。また、p53 の ubiquitin ligase である MDM2 はプロテアソームによる p53 の分解を促進しネガティブフィードバックを形成することが知られている。

p53 は 393 アミノ酸からなるタンパクで、N 末端ドメイン、中央のコアドメイン、C 末端ドメインの 3 つの領域から構成される (Bode and Dong, 2004)。N 末端ドメインには酸性アミノ酸に富む転写活性化ドメインが存在し、またそのドメイン内に MDM2 の結合領域が存在する。コアドメインは配列特異的な DNA 結合に関与しており、また p53 に見られる変異のほとんどがこの領域で起こるミスセンス変異であることが知られている。C 末端ドメインには NLS、nuclear export signal (NES)、4 量体形成ドメインと塩基性アミノ酸に富む DNA 結合能調節ドメインが存在する。DNA 結合能調節ドメインはコアドメインによる配列特異的な DNA 結合を調節する。

p53 は細胞の運命を決定づける重要な因子であるため、その活性はリン酸化やアセチル化といった翻訳後修飾を介して厳密に制御されている (Bode and Dong, 2004)。リン酸化部位の多くは N 末端ドメインに集中しており、細胞が DNA 損傷などのストレスを感知するとこれらのリン酸化が亢進することで、MDM2 との結合が減弱し安定化が誘導されると考えられている。その他にも、MDM2 は p53 の転写活性化ドメイン内に結合し転写活性を阻害する機能や、p53 をモノユビキチン化することで核外輸送を促進する機能を有しており、アミノ末端のリン酸化は安定化のみでなく、転写活性の上昇や核外輸送の阻害にも関与していることが報告されている (Li et al., 2003)。代表的な N 末端ドメインのリン酸化部位としては、DNA 損傷のセンサーである ATM (ataxia telangiectasia-mutated) や ATR (ATM-Rad3-related) などによって直接リン酸化される Ser15 (マウスの Ser18 に相当) や、ATM や ATR によって活性化された CHK (checkpoint kinase) 1/2 などによってリン酸化される Ser20 (マウスの Ser23 に相当) などが挙げられる。

一方 p53 のアセチル化部位は C 末端ドメインに多く見られる。アセチル化を受けるカルボキシル末端のリシン残基はユビキチンによっても修飾もされることから、ア

セチル化はユビキチン化を阻害し、安定化に寄与すると考えられる。またアセチル基転移酵素 p300/CBP (CREB binding protein) によってアセチル化される Lys373 (マウスの Lys370 に相当) と Lys382 (マウスの Lys379 に相当) は DNA 結合能調節ドメインに存在することから、配列特異的 DNA 結合能の調節にも関与している。

p53 にはこの他にも多数のリン酸化部位やアセチル化部位が存在し、修飾する酵素もまた多様であることなどから、ある刺激に応答して p53 が特有の修飾パターンを示すことで適切な下流遺伝子を誘導するのではないかと考えられている。実際に継代による細胞老化においては Ser15、Thr18、Ser376 のリン酸化、Ser392 の脱リン酸化など、紫外線照射した細胞や増殖停止した細胞とは異なるパターンを示すことが報告されている (Webley et al., 2000)。また RAS によって誘導される細胞老化においては Ser15、Ser33、Ser37、Ser46 のリン酸化、Lys382 のアセチル化などが報告されているが (Bulavin et al., 2002; Ferbeyre et al., 2002; Pearson et al., 2000; Sun et al., 2007)、それぞれの修飾の意義については、細胞種や用いた変異体の違いなどから様々であり未だ明確ではない部分が多くある。

本章では MORC3 が ATPase 活性依存的に p53 の転写活性を上昇させることを示した。また活性化メカニズムを明らかにするため、p53 の安定化や翻訳後修飾についても検討した。

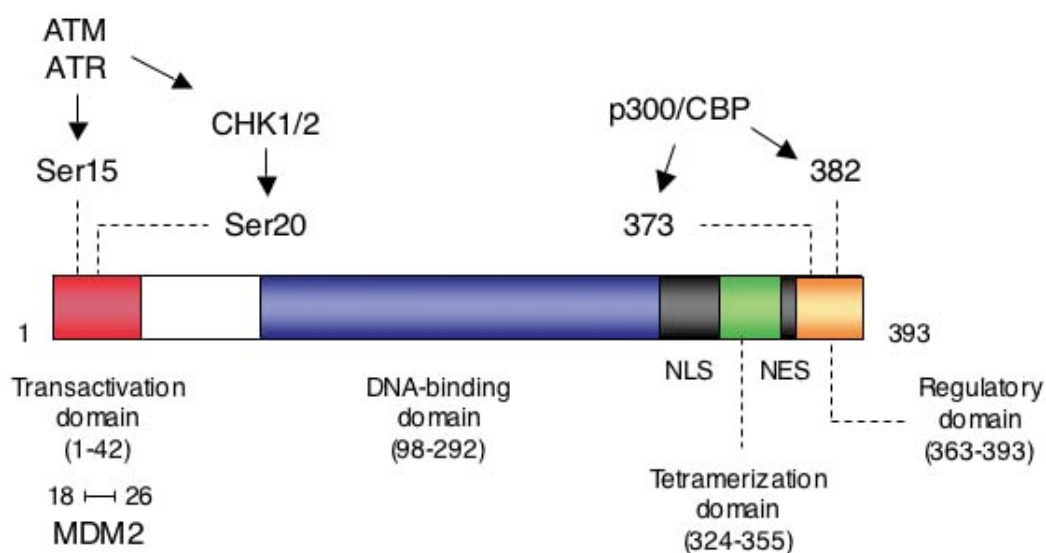


Figure 2-1 p53 のドメイン構造と修飾部位

2-1 材料と方法

2-1-1 細胞培養

ヒト骨肉腫細胞株 U-2 OS は McCoy's 5A (Sigma)、ヒト肺非小細胞癌細胞株 H1299 は RPMI 1640 (Sigma)、MEF およびレトロウイルスの産生用パッケージング細胞株 Plat-A、及び Plat-E は DMEM (Sigma)、ヒト胎児肺由来繊維芽細胞株 WI-38 (RIKEN cell bank) は MEM (Invitrogen) を用いて 37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。培地には 10% (v/v) 非働化 FBS (Gibco)、100U/ml penicillin G potassium (明治)、100µg/ml streptomycin sulfate (明治)を添加した。細胞の回収には、trypsin-EDTA (Nacalai tesque) を用いた。

2-1-2 プラスミドの作製

pMEPy-FLAG、pMEPy-HA ベクターは、アミノ末端に FLAG あるいは HA が融合したタンパクを発現させるため作製された (Ohishi et al., 2000)。pMEPy-FLAG-MORC3 と pMEPy-HA-p53 は、開始コドン を SalI site で置き換えた human MORC3 フラグメントと human p53 フラグメントを、それぞれ pMEPy-FLAG ベクターと pMEPy-HA ベクターに導入することで作製された。pME -I-P ベクターは pIRESpuro2 (Takara Bio) に由来する internal ribosomal entry site-puromycin resistance gene (I-P) フラグメントを pME ベクターに組み込むことで作製された。pME-EGFP-MORC3-I-P は、終止コドン を SalI site で置き換えた EGFP フラグメントと、開始コドン を SalI site で置き換えた human MORC3 フラグメントを pME-I-P ベクターに導入し作製された。

MORC3-E35A mutant の作製には、Quikchange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いた。条件は添付文書に従い、使用したプライマーは以下に示した。

Forward: 5'-CTGGCCATTCAGTGCAGTTGCAGCGCTAATAGATAATGCTTAT
GATCC-3'

Reverse: 5'-GGATCATAAGCATTATCTATTAGCGCTGCAACTGCACTGAATG
GCCAG-3'

シーケンスと制限酵素処理によって作製した全てのプラスミドの構造が正しいことを確認した。

2-1-2 遺伝子導入

U-2 OS cell へのトランスフェクションには FuGENE 6 (Roche)、H1299 cell へのトランスフェクションには Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い、条件は添付文書に従った。レトロウイルスによる遺伝子導入は 1-1-3 と同様に行った。

2-1-3 レポーターアッセイ

p53 の転写活性の測定には、pGL3-Promoter (Promega)の SV40 プロモーターの上流に 12 個の p53 結合配列 (5'-CCTGCCTGGACTTGCTGG-3') (el-Deiry et al., 1993) を

含んだレポーターベクターpGL3-PG12S を用い、ネガティブコントロールとしては p53 結合配列の代わりに 14 個の変異型 p53 結合配列 (5'-CCTTAATGGACTTTAATGG-3') を含む pGL3-MG14S を用いた。またトランスフェクション効率を標準化するため、pGL3-Promoter の Firefly luciferase 遺伝子を phRL-TK Vector (Promega) 由来の Renilla luciferase 遺伝子で置換した内部コントロール用ベクターpGL3-Renilla を同時にトランスフェクションした。

レポーターベクターpCBG99-p21とpCBG99-BaxはpCBG99-Basic (Promega) の緑色発光luciferase遺伝子の上流に、それぞれp21のプロモーター領域 (2.4Kbp) (el-Deiry et al., 1993)とBaxのプロモーター領域 (-690bp to -317bp) (Miyashita and Reed, 1995) を含んでいる。内部コントロールベクターpCBR-SV40proはpGL3-Control (Promega)由来のSV40プロモーターにより制御される。

トランスフェクションするDNAの総量はpMEPyベクター、またはpMEPy-GSTを用いて一定になるよう調整した。luciferase 活性はDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) またはChroma-Glo Luciferase Assay System (Promega)を用いてluminescence reader BLR-201 (ALOKA)、あるいはMithras LB 940 (BERTHOLD) で測定した。実験はトリプリケートで行い、値はその平均を示した。

2-1-4 ウエスタンブロット

1 次抗体として、mouse monoclonal anti-p53 (DO-1; Santa Cruz)、rabbit polyclonal anti-mouse p53 (CM5; Novocastra)、rabbit polyclonal anti-p21 (C-19; Santa Cruz)、rabbit polyclonal anti-phospho-p53 (Ser15) (Cell Signaling)、rabbit polyclonal anti-phospho-p53 (Ser20) (Cell Signaling)、rabbit polyclonal anti-acetyl-p53 (Lys373, Lys382) (Upstate)、mouse monoclonal anti- β -tubulin (TUB 2.1; Sigma) を、2 次抗体として peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG (Sigma) または peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) を用いた。その他の条件は 1-1-4 と同様に行った。

2-2 結果

2-2-1 MORC3 は ATPase 活性依存的に p53 の転写活性を制御する

MORC3 が p53 の転写活性に関与しているかを調べるため、レポーターアッセイを行った。正常型 p53 遺伝子を持つヒト骨肉腫細胞 U-2 OS cell に、p53 結合配列を含むレポーターベクターpGL3-PG12 と pMEPy-FLAG-MORC3 を同時にトランスフェクションし luciferase 活性を調べたところ、MORC3 の高発現によって、活性が 4.2 倍に上昇していることがわかった (Figure 2-2)。また、活性の上昇は MORC3 の量依存的であった (Figure 2-3)。変異型 p53 結合配列を含むレポーターベクターpGL3-MG14S を用いた場合にはこのような上昇は見られなかったことから (Figure 2-2, 3)、

p53 依存的に転写が誘導されたと考えられる。

また、ATPase の活性部位である 35 番目のグルタミン酸をアラニンに変換した mutant、MORC3-E35A を発現させた場合には転写活性の上昇は認められなかったことから (Figure 2-2)、MORC3 は ATPase 活性依存的に p53 の転写活性を制御していることが示唆された。

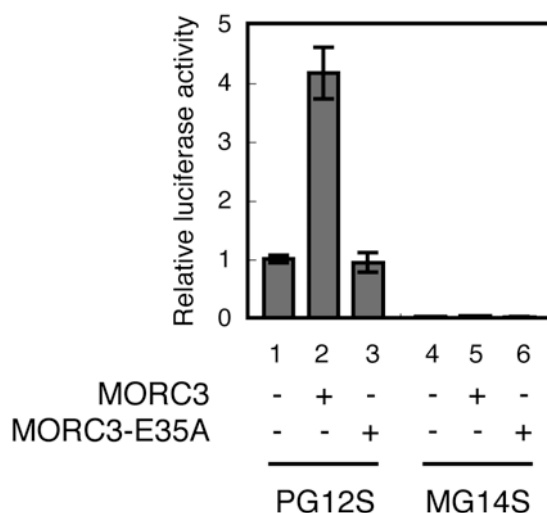


Figure 2-2 MORC3によるp53の活性化

U-2 OS cellを 1.2×10^4 cell/wellで96 well plateに播き、レポーターベクターpGL3-PG12S (35ng) またはpGL3-MG14S (35ng)、発現ベクターpMEPy-FLAG-MORC3 (35ng) またはpMEPy-FLAG-MORC3-E35A (35ng)、内部コントロールベクター pGL3-Renilla (7ng) を同時にトランスフェクションして、luciferase活性を測定した。トランスフェクションするDNAの総量はpMEPy-GSTを用いて一定になるように調整した。

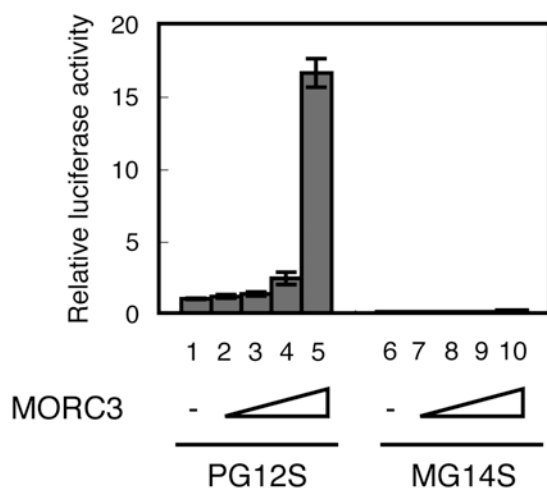


Figure 2-3 MORC3の量依存的なp53の活性化

U-2 OS cell を 7×10^3 cell/well で 96 well plate に播き、レポーターベクターpGL3-PG12S (35ng) または pGL3-MG14S (35ng)、pMEPy-FLAG-MORC3 (0、8.75、17.5、35、70ng)、内部コントロールベクターpGL3-Renilla (7ng) を同時にトランスフェクションして、luciferase 活性を測定した。トランスフェクションする DNA の総量は pMEPy を用いて一定になるように調整した。

2-2-2 MORC3 は p53 下流遺伝子のプロモーターに作用する

MORC3 が p53 の下流遺伝子のプロモーターに対しても影響するかを調べるため、p53 欠失細胞 H1299 cell に、p53 下流遺伝子 *p21* のプロモーター領域を含むレポーターベクターpCBG99-p21 または *Bax* のプロモーター領域を含むレポーターベクターpCBG99-Bax と、pMEPy-HA-p53、pMEPy-FLAG-MORC3 を同時にトランスフェクションし、luciferase 活性を調べた。その結果、MORC3 の高発現によって pCBG99-p21 では約 2.5 倍、pCBG99-Bax では約 2.6 倍、活性が上昇していることがわかった (Figure 2-4)。p53 非存在下では、このような上昇は見られなかったことから、p53 依存的に転写が誘導されたと考えられる。

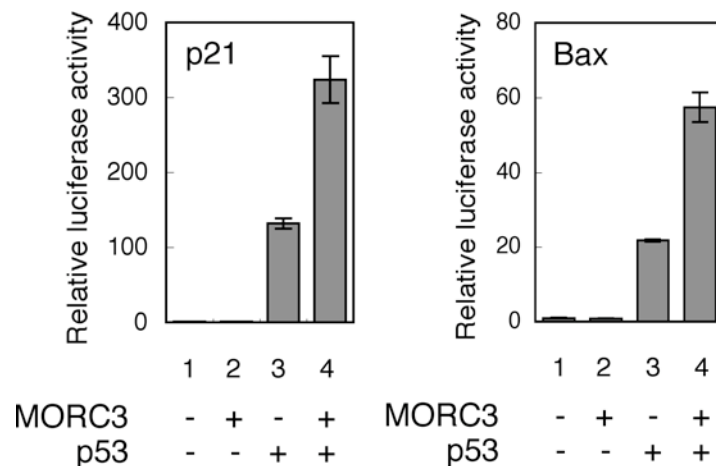


Figure 2-4 MORC3によるp21およびBaxプロモーターの活性化

H1299 cellを 1.2×10^4 cell/wellで96 well plateに播き、〔左図〕レポーターベクターpCBG99-p21 (28.6ng)、pMEPy-HA-p53 (0.7ng)、pMEPy-FLAG-MORC3 (57.1ng)、内部コントロールベクターpCBR-SV40pro (228.6ng)、または〔右図〕レポーターベクターpCBG99-Bax (114.3ng)、pMEPy-HA-p53 (5.7ng)、pMEPy-FLAG-MORC3 (71.4ng)、内部コントロールベクターpCBR-SV40pro (57.1ng) を同時にトランスフェクションして、luciferase活性を測定した。トランスフェクションするDNAの総量はpMEPyを用いて一定になるよう調整した。

2-2-3 MORC3 の高発現は内在性 p21 の発現を誘導する

MORC3 による p53 の活性化をタンパクレベルでも検証するため、U-2 OS cell に MORC3 または MORC3-E35A を高発現させウエスタンブロットを行ったところ、MORC3 を発現した細胞では p21 のタンパク量が顕著に増加していたが、MORC3-E35A では増加は認められなかった (Figure 2-5)。この結果はレポーターアッセイの結果と一致しており、MORC3 が ATPase 活性依存的に p53 を活性化することを示している。そこで p53 の活性化に安定化が関与しているかどうかを明らかにするため、抗 p53 抗体、DO-1 (ただし Ser20 がリン酸化された p53 は認識できない) (Bond et al., 1999) を用いてタンパク量を調べた。その結果、Wt の MORC3 だけでなく、p21 の発現を誘導できない MORC3-E35A を発現した細胞でも p53 の安定化が見られた。このことから、MORC3 は p21 の発現を誘導するのとは別の機構で、ATPase 活性非依存的に p53 の安定化を誘導している可能性が考えられる。

p21 の発現は p53 以外にも、細胞分化における MyoD やストレス応答における MAPK カスケードなどによって制御されることが知られており、MORC3 による p21 の発現誘導が p53 依存的でない可能性も考えられた。そこでその可能性を除外するため、p53 ノックアウトマウス由来の MEF に EGFP-MORC3 を高発現させ、p21 のタンパク量を調べた。その結果、p53^{-/-} MEF では Wt MEF に比べて、MORC3 による p21 のタンパクの増加量が極めて少ないことがわかった (Figure 2-6)。これらの結果は MORC3 が ATPase 活性依存的に p53 を活性化し p21 の発現を誘導することを示唆する。しかし、p53^{-/-} MEF でも MORC3 の高発現によって微弱ながら p21 のタンパク量の増加が見られたことから、MORC3 は p53 経路以外にも p21 の発現量を制御する機構に関与していることが予想される。

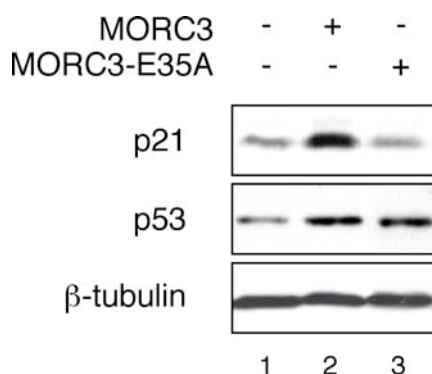


Figure 2-5 MORC3によるp53の安定化とp21の発現誘導

U-2 OS cell を 1.4×10^6 cell/dish で 100mm dish に播き、pME-puro (5 μ g)、pME-EGFP-MORC3-I-P (5 μ g)、pME-EGFP-MORC3-E35A-I-P (5 μ g) をそれぞれトランスフェクションした。3日後に、細胞を回収し、抗p21、抗p53 (DO-1)、または抗 β -tubulin抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

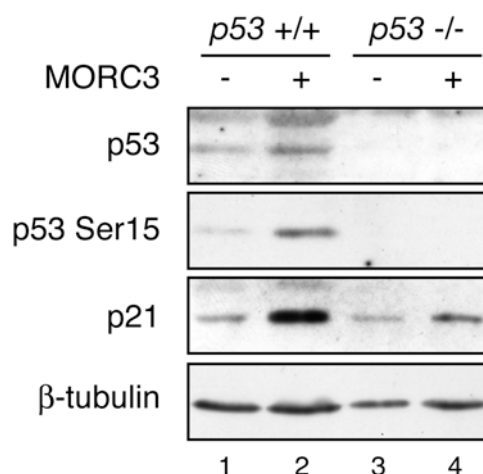


Figure 2-6 MEF における MORC3 の p53 経路への影響

p53+/+ (lane 1, 2)、あるいは p53-/- (lane 3, 4) MEF に、レトロウイルスベクターpLNCX2-EGFP-I-P (lane 1, 3)、pLNCX2-EGFP-MORC3-I-P (lane 2, 4) を用いてそれぞれを高発現させ、day 3 で細胞を回収し、抗 p53 (CM5)、抗 p53 Ser15、抗 p21、抗 β -tubulin 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。p53+/+ と p53-/- MEF は littermate から調整した。

2-2-4 MORC3の高発現はp53のSer15におけるリン酸化を促進する

MORC3によるp53の活性化に翻訳後修飾が関与しているかどうかを調べるため、WI-38 cellにレトロウイルスを用いてEGFP-MORC3を高発現させ、puromycinによる選択終了後から3日目にウエスタンブロットを行った。その結果、MORC3の高発現した細胞では、p53の安定化に加えてSer15におけるリン酸化が亢進していることがわかった (Figure 2-7)。さらにLys373とLys382におけるアセチル化についても検討したが、MORC3の発現による著しい変化はみられなかった。またMEFにおいても同様にMORC3の高発現によってSer15におけるリン酸化が亢進していることを確認した (Figure 2-6)。

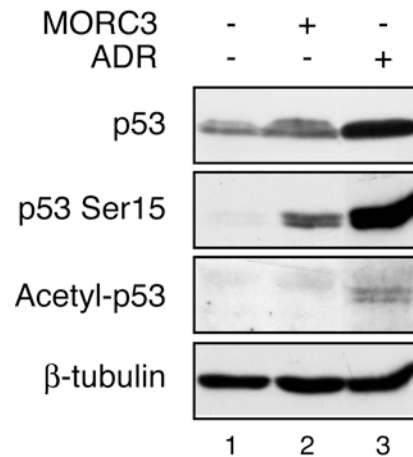


Figure 2-7 MORC3 による p53 の翻訳後修飾への影響

WI-38 cell にレトロウイルスベクター pLNCX2-EGFP-I-P (lane 1)、pLNCX2-EGFP-MORC3-I-P (lane 2) を用いてそれぞれを高発現させ、day 3 で細胞を回収し、抗p53 (DO-1)、抗p53 Ser15、抗Acetyl-p53 (K373, K382)、抗β-tubulin 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。またポジティブコントロールとして、1μg/ml adriamycin で12時間処理した WI-38 cell を用いた (lane 3)。

2-2-5 *Morc3*^{-/-} MEF では p21 の誘導が障害される

MORC3 非存在下で DNA 損傷による p53 活性化が正常に誘導されるかどうかを明らかにするため、*Morc3* ノックアウトマウス由来の MEF を DNA 損傷剤 adriamycin で処理しウエスタンブロットを行った。その結果、*Morc3*^{-/-} MEF では、Wt MEF と同様に p53 の安定化が誘導され、Ser18、Ser23 (ヒトの Ser15、Ser20 に相当) におけるリン酸化が亢進しているにもかかわらず、p21 の発現誘導が抑制されていた (Figure 2-7, 8)。Lys370 と Lys379 (ヒトの Lys373 と Lys382 に相当) におけるアセチル化については *Morc3*^{-/-} MEF において若干の減弱が認められた。これらの結果から、MORC3 は DNA 損傷による p53 の安定化と Ser15、Ser20 のリン酸化においては必須ではないが、p21 の発現誘導においては重要な役割を担っていることが示唆される。

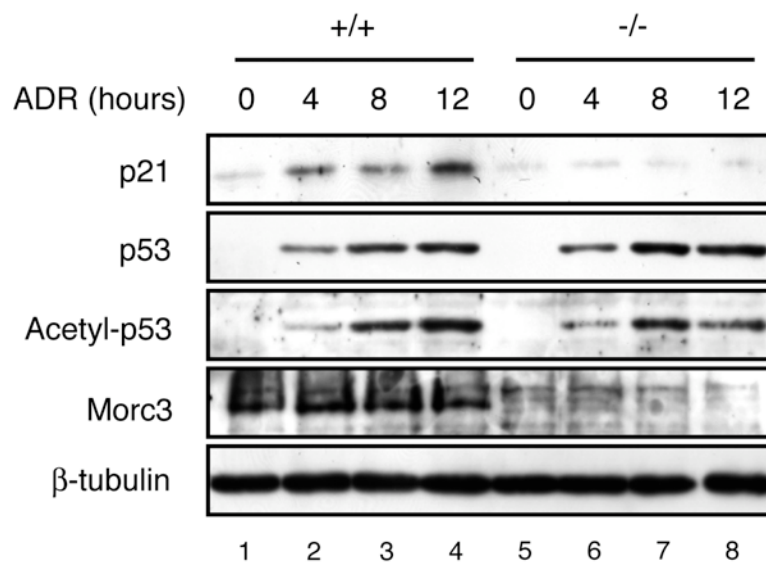


Figure 2-8 *Morc3*^{-/-} MEFにおけるp21の発現誘導の抑制

Morc3^{+/+}または*Morc3*^{-/-} MEFを 1.5×10^5 cell/wellで6well plateに播き、 $1 \mu\text{g/ml}$ adriamycin (ADR) で0、4、8、12時間処理した後、抗p21、抗p53、抗Acetyl-p53 (K373, K382)、抗MORC3、または抗β-tubulin抗体を用いてウエスタンブロットを行った。*Morc3*^{+/+}と*Morc3*^{-/-} MEFは littermateから調整した

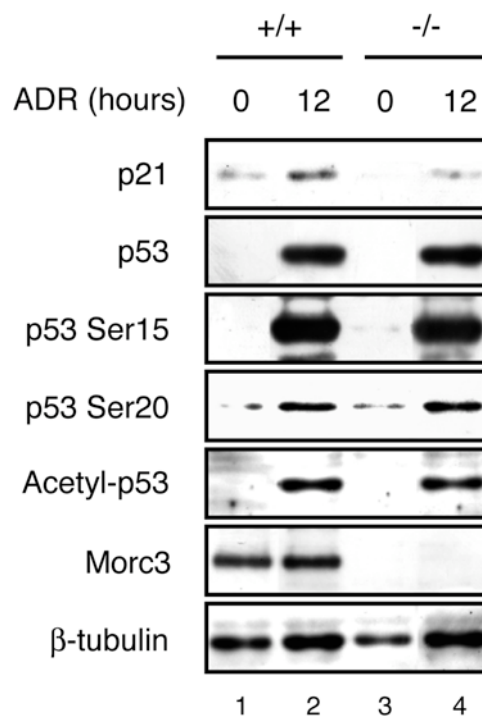


Figure 2-9 *Morc3*^{-/-} MEFにおけるp53の翻訳後修飾

Morc3^{+/+}または*Morc3*^{-/-} MEFを3X10⁵cell/wellで60mm dishに播き、1μg/ml adriamycin (ADR) で12時間処理した後、抗p21、抗p53、抗p53 Ser15、抗p53 Ser20、抗Acetyl-p53、抗MORC3、または抗β-tubulin抗体を用いてウエスタンブロットを行った。*Morc3*^{+/+}と*Morc3*^{-/-} MEFはlittermateから調整した

2-3 考察

本章では、まず MORC3 の高発現が p53 の転写活性を上昇させることをレポーターアッセイにより明らかにした (Figure 2-2, 3, 4)。また、その際 MORC3 は細胞周期の停止に関与する p21 と、アポトーシスの誘導に関与する Bax、両方のプロモーターに作用したことから (Figure 2-4)、少なくともレポーターアッセイにおいては下流遺伝子の選択性は認められなかった。また p21 の発現量を調べることにより、MORC3 の高発現が内在性のプロモーターにも作用することを明らかにした (Figure 2-5)。

p53^{-/-} MEF では、MORC3 の高発現による p21 の発現誘導が著しく抑制されたが、微弱ながらも p21 の発現誘導が見られたことから (Figure 2-6)、MORC3 は p53 経路以外にも p21 の発現量を制御する機構に関与していることが予想される。最近、DNA 損傷による p21 の発現誘導とは異なり、継代による細胞老化に伴う p21 の発現誘導には、p53 依存的経路と p53 非依存的経路の両方が関与していることが報告された (Ide, 2006)。老化細胞に MAPK カスケードの阻害剤を加えると p21 の発現が抑制されることから、現在までのところ p53 非依存的経路には MAPK カスケードが想定されている。これらを考え合わせると、MORC3 の高発現による老化誘導のシグナルは p53 経路の他にも例えば MAPK カスケードなどを介して p21 の発現を誘導している可能性が考えられる。

また本章では、MORC3 による p53 の転写活性の上昇や p21 の発現誘導が MORC3 自身の ATPase 活性に依存していることも示した (Figure 2-3, 5)。しかし、ATPase 不活性型 mutant でも p53 の安定化が見られたことから、MORC3 の高発現によって ATPase 活性非依存的に何らかのシグナルが誘導され p53 の安定化が起こったと考えられる。

そこでこの影響を除外するため、*Morc3* ノックアウトマウス由来の MEF を用いて、内在性 MORC3 が p53 の活性化にどの程度関与しているかを検討した。DNA 損傷条件下で p53 の活性化を調べたところ、*Morc3*^{-/-} MEF では、Wt MEF と同様に p53 の安定化が誘導され、Ser18、Ser23 (ヒトの Ser15、Ser20 に相当) におけるリン酸化が亢進しているにもかかわらず、p21 の発現誘導が顕著に抑制されていた (Figure 8, 9)。これらの結果は、p53 の安定化に *Morc3* が必須ではないことを示すとともに、*Morc3* が安定化以外のメカニズムで p53 の活性化を制御している可能性を示している。ま

た Lys370 と Lys379 (ヒトの Lys373 と Lys382 に相当) におけるアセチル化については *Morc3*^{-/-} MEF において若干の減弱が認められたが、これだけで p21 の発現誘導が著しく異なるとは考えにくく、さらに別の部位におけるリン酸化やアセチル化、あるいは NEDD8 化や SUMO-1 化などが関与している可能性も考えられる。

最近の研究により、p53 の活性制御には翻訳後修飾だけでなく細胞内における局在もまた重要であることが明らかになりつつある (O'Brate and Giannakakou, 2003)。p53 は、上述した MDM2 による核外輸送や importin- α による核内輸送などにより核と細胞質を往復することが知られており、実際にいくつかの腫瘍では p53 が細胞質に蓄積することで活性化が抑制されていることが報告されている。またミトコンドリアや、核内構造体の 1 つである PML body といった微小な構造体への局在も確認される。ミトコンドリアは p53 による転写非依存的なアポトーシスの誘導に関与し、PML body は p53 と活性調節因子の相互作用の場であると考えられている。

MORC3 非存在下では、p53 が安定化しているにもかかわらず転写を誘導しないことから、MORC3 は p53 の細胞内局在を制御することで、結合配列への効率的なリクルートを促進しているのではないかと予想される。そこで、MORC3 と p53 の局在について次章以降で詳細に検討した。

第3章 MORC3の細胞内局在

細胞質にミトコンドリアや小胞体などのオルガネラが存在するように、核内にも rRNA の合成場所である核小体や、スプライシングに関与する Cajal body など、いくつかの機能ドメインが存在する。PML body もその 1 つで、ほぼ全ての哺乳類細胞に存在することが知られている。別名を ND10 と言い、これは核内にドットが (nuclear dots) 10 個程度存在することによって由来しているが、実際には PML body の大きさや数は細胞の内外の環境によって動的に変化することが報告されている (Dellaire and Bazett-Jones, 2004; Dellaire et al., 2006a; Dellaire et al., 2006b)。

PML body には PML を始めとして Sp100 や CBP、p53 などの転写制御に関わるタンパクが多数含まれているが、恒常的に局在するのは PML と Sp100 のみで、その他のタンパクは、様々なシグナルに応じて PML body と核質の間を行き来することが知られており (Negorev and Maul, 2001)、PML body はタンパクの構成を調節することで転写を制御し、細胞周期の停止やアポトーシス、細胞老化、ウイルス感染時の免疫応答など多様な現象に関与すると考えられている。

もともと PML は acute promyelocytic leukemia (APL) の原因遺伝子として発見された癌抑制遺伝子である。15 番染色体と 17 番染色体の相互転座による融合タンパク PML-retinoic acid receptor α (RAR α) が発現した APL 細胞では、正常な PML body の形成が阻害されているが、実際の治療にも使用される all trans retinoic acid (ATRA) で処理することにより、PML-RAR α の分解が誘導され、正常アレル由来の PML のみで PML body が再形成される (Zhu et al., 2001)。この時 APL 細胞では分化やアポトーシスが誘導され、APL は寛解する。このことから PML は正常な PML body の形成に必須であると考えられており、PML ノックアウトマウス由来の細胞では Sp100 や CBP といった他の構成要素が異常な局在を示すことから (Zhong et al., 2000a)、PML の重要性が示されている。逆に Sp100 を欠失した細胞では PML の局在変化は観察されないことから (Ishov et al., 1999)、PML のみが PML body の足場タンパクとして機能していると考えられている。

また PML 遺伝子は 9 つのエキソンから構成され、スプライシングによって少なくとも 7 つのアイソフォームを産生することが知られている (Jensen et al., 2001)。これら PML I から VII は、いずれもアミノ末端側に tripartite motif (TRIM ; RING finger、B-box、coiled-coil) と呼ばれる共通したドメインを有しており (Reymond et al., 2001)、多量体形成に関与している。またエキソン 6 には NLS が存在し、この領域を含む PML I から VI は PML body に局在する。これらのアイソフォームはカルボキシル末端に多様性を有し、それぞれに相互作用するタンパクが異なると考えられている。例えば、これらのアイソフォームのうち PML IV の高発現だけが細胞老化を誘導することができるが、この現象は PML IV 特異的な領域に p53 が直接に相互作用し活性化

されるためであることが示されている (第 4 章に詳述)。また最近では、アイソフォームによって相互作用する matrix attachment region (MAR ; 転写制御領域近傍の非コード領域に存在する配列で、足場である核マトリックスに結合し、安定なクロマチンループの形成に関与する) が異なる可能性も示唆されている (P et al., 2007)。組織や細胞種、あるいはインターフェロンなどの刺激によってアイソフォームの構成が変化することから (Condemine et al., 2006)、PML body がアイソフォームの多様性によって局在するタンパクや周辺のクロマチン構造を調節している可能性も考えられる。

PML body には転写制御に関わるタンパクが多数存在するが、実際にそこが転写の場であるかは未だ結論されていない。PML body には転写を活性化する因子と抑制する因子の両方が存在することなどから、転写は PML body の外で起こり、PML body は転写調節因子の濃度を調整する貯蔵場所として機能するというモデルや PML body は翻訳後修飾を介した転写因子の活性調節の場であるというモデルが考えられている (Zhong et al., 2000b)。一方で PML body の辺縁に新生 RNA や RNA polymerase II が存在することも報告されており (Kiesslich et al., 2002)、PML 近傍で転写が起こっていることも予想される。これらは矛盾するようであるが、転写活性化部位と一致する PML body は同一細胞内においても一部でしかないことから、PML body が構造的にも機能的にも不均一であることを示唆しているかもしれない。

本章では MORC3 が自身の ATPase 活性依存的に PML body に局在化することを明らかにした。またその局在化に PML が必須であるかについても検討した。

3-1 材料と方法

3-1-1 培養細胞

ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa と MEF、レトロウイルスの産生用パッケージング細胞株 Plat-A は DMEM (Sigma)、ヒト骨肉腫細胞株 Saos-2 は McCoy's 5A (Sigma)、ヒト APL 由来細胞株 NB4 は RPMI 1640 (Sigma)、ヒト胎児肺由来繊維芽細胞株 WI-38 (RIKEN cell bank) は MEM (Invitrogen) を用いて 37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。培地には、10% (v/v) 非働化 FBS (Gibco) (Saos-2 のみ 15%)、100U/ml penicillin G potassium (明治)、100mg/ml streptomycin sulfate (明治) を添加した。細胞の回収には、trypsin-EDTA (Gibco) を用いた。

3-1-2 プラスミドの作製

pME-FLAG-MORC3-I-P は pMEPy-FLAG-MORC3 由来の FLAG-MORC3 フラグメントを pME-I-P ベクターに導入することで作製された。

レトロウイルスベクターpLNCX FLAG-PML IV I-P は、まず pME-FLAG-MORC3-I-P に由来する FLAG-MORC3-I-P フラグメントを pLNCX2 vector (Takara Bio) の EcoRI と NotI の間に組み込み pLNCX2-FLAG-MORC3-I-P を作製し、その MORC3 フラグメントを PML IV フラグメントで置換することによって作製された。

pH1'-SV40-puro は SV40 プロモーターによって制御されるよう設計された puromycin resistance gene を含むフラグメントを pH1'ベクター (Hasuwa et al., 2002) に組み込むことで作製された。PML ノックダウンベクターpH1'-shRNA-PML1555-puro は次のような shRNA 配列を含んでいる。

5'-CCCGGGGTACAAGAAGCAGGAAAGTTCAAGAGACTTTCCTGCTTCTT
GTACCCCTTTTTGGAAA-3'

シーケンスと制限酵素処理によって作製した全てのプラスミドの構造が正しいことを確認した。

3-1-3 トランスフェクション

Saos-2 cell には FuGENE HD (Roche)、HeLa cell には PolyFect (Qiagen) を使い、条件は添付文書に従った。レトロウイルスによる遺伝子導入は 1-1-3 と同様に行った。

3-1-4 細胞の免疫染色

細胞を Lab-Tek II chamber slides (Nalge Nunc) にまき、一晚培養した後 4% PFA で 30 分固定し、0.1% TritonX-100 で 15 分処理して、5% FBS/PBS または 1% BSA でブロッキングした。その後 mouse monoclonal anti-MORC3 (17A9)、mouse monoclonal anti-PML (PG-M3; Santa Cruz)、rabbit polyclonal anti-PML (H-238; Santa Cruz)、goat polyclonal anti-mouse Pml (E-15; Santa Cruz)、rabbit polyclonal anti-Sp100 (Chemicon)、rabbit polyclonal anti-CBP (A-22; Santa Cruz)、mouse monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma) または rabbit polyclonal anti-FLAG (Sigma)と反応させ、次に Alexa Flour 594-coupled donkey anti-goat IgG (Invitrogen)、または Alexa Flour 488 (または 594)-coupled donkey anti-mouse IgG (Invitrogen)、Alexa Flour 488 (または 594)-coupled donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen) と反応させて、Perma fluor aquaous mounting medium (Thermo Shandon) で封入した。

NB4 cell は 1 μ M ATRA (Sigma) または溶媒の dimethyl sulfoxide (DMSO、Wako) で 3 日間処理した後、Shandon Cytospin 4 (Thermo electron) を用いてスライドガラスに接着させた。観察は Radiance 2000 laser scanning system (Bio-Rad) を搭載した BX51 microscope (Olympus) を用いて行った。

3-1-5 細胞内 ATP の枯渇

pME-FLAG-MORC3-I-P をトランスフェクションした HeLa cell を Lab-Tek II chamber slides (Nalge Nunc)に移し、一晚培養した。その後、10mM sodium azide (Wako)と 50mM

2-deoxyglucose (Sigma) を含む glucose-free DMEM (Invitrogen) で 30 分培養することで細胞内の ATP を枯渇させ (Platani et al., 2002)、3-1-4 と同様に固定、染色した。経時的観察には EGFP による凝集を防ぐため、pME-EGFP-MORC3-I-P と pME-FLAG-MORC3-I-P を 1:8 でトランスフェクションした細胞を用いた。生細胞の観察には IX70 microscope (Olympus) と CoolSnap cf CCD camera (Roper Scientific) を使用した。

3-2 結果

3-2-1 MORC3 は PML body に局在する

MORC3 の細胞内局在を調べるため、当研究室で作製されたマウス抗 MORC3 モノクローナル抗体 17A9 を用いて、MEF の免疫染色を行った。その結果 Wt の MEF では核小体を除く核全体が染色された (Figure 3-1)。また核内に少数のドットが観察され、これらは PML body の足場タンパク Pml と共局在していたことから (Figure 3-2)、Morc3 の一部は PML body に局在していることがわかった。

ヒト骨肉腫細胞株 Saos-2 cell、ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa cell においても MORC3 の局在を調べたところ、MEF と同様に核全体が染まり、さらに核内にいくつかの明瞭なドットが見られた (Figure 3-3, 4)。これらのドットは PML あるいは PML body に恒常的に局在することが知られている Sp100 と共局在したことから、ヒトの細胞においても MORC3 は PML body に局在していることがわかった。

また HeLa cell に FLAG-MORC3 を発現させ免疫染色を行った場合にも、核内にドット状の染色像が観察された。これらのドットはほぼ全ての細胞で PML と共局在し、Sp100 とは 44%の細胞で局在が一致した (Figure 3-5)。

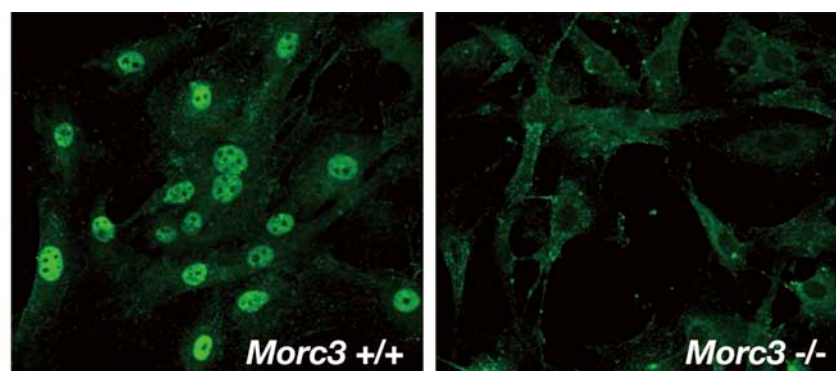


Figure 3-1 抗MORC3抗体を用いたMEFの染色

littermateから調整した*Morc3*^{+/+} MEFと*Morc3*^{-/-} MEFを、抗MORC3抗体 (17A9) を用いて免疫染色した。

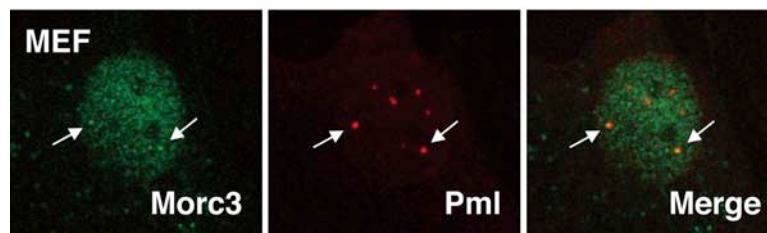


Figure 3-2 MEFにおけるMorc3の局在

Morc3^{+/+} MEF を抗 MORC3 抗体 (17A9) と抗 Pml 抗体 (E-15) を用いて共染色した。
Morc3 の染色により核内に観察されたドットを矢印で示した。

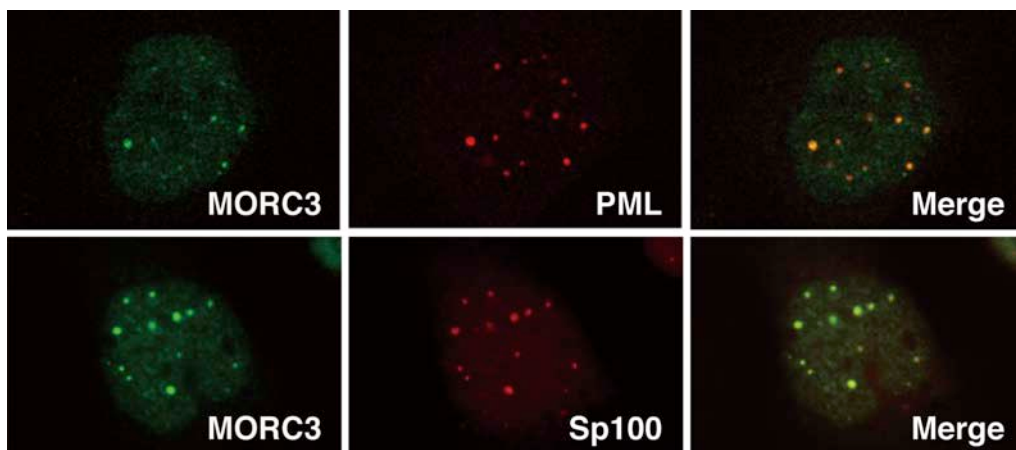


Figure 3-3 Saos-2 cellにおけるMORC3の局在

Saos-2 cellを抗MORC3抗体 (17A9) と、抗PML (H-238) または抗Sp100抗体で共染色した。

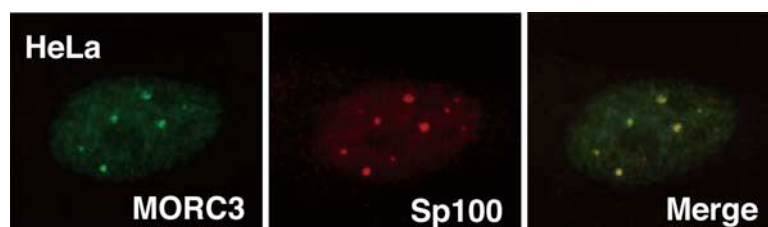


Figure 3-4 HeLa cellにおけるMORC3の局在

HeLa cellを抗MORC3抗体 (17A9) と抗Sp100抗体で共染色した。

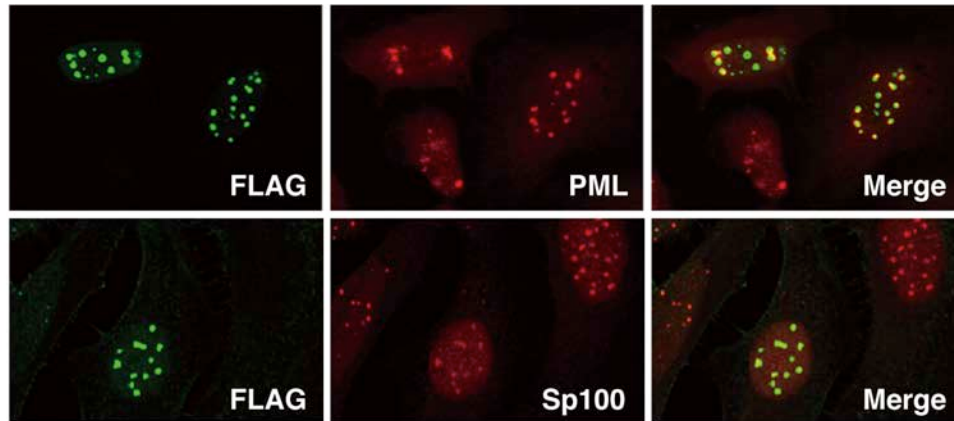


Figure 3-5 FLAG-MORC3の細胞内局在

HeLa cellにpMEPy-FLAG-MORC3をトランスフェクションし、2日後に抗FLAG抗体と、抗PML (PG-M3) または抗Sp100抗体で共染色を行った。

3-2-2 MORC3 の PML body への局在は PML 依存的である

ヒト APL 由来細胞株 NB4 cell では融合タンパク PML- RAR α の発現により PML body の構造が破壊されているが、ATRA で処理することにより PML-RAR α の分解が誘導され、正常アレル由来の PML で PML body が再形成されるため、構成タンパクである Sp100 や CBP の局在化が見られるようになる (Figure 3-6)。NB4 cell における内在性 MORC3 の局在を調べたところ、ATRA 処理前では、核小体を除く核全体に拡散しており、PML との共局在が確認された細胞は僅か 2.9%であったが、ATRA で 3 日間処理した細胞では 15.4%の細胞で PML との共局在が観察された (Figure 3-7)。さらに、Saos-2 cell に PML ノックダウンベクターpH1'-shRNA-PML1555-puro をトランスフェクションし PML (PML VII を除く) の発現を抑制したところ、MORC3 のドットが 2 個以下の細胞がコントロールでは 38.5%だったのに対し、73.3%まで増加していた (Figure 3-8)。これらの結果は MORC3 の PML body への局在化に PML が必須である可能性を示唆している。

また、レトロウイルスを用いて FLAG-PML IV を WI-38 cell に高発現させた場合には内在性 MORC3 が PML body へと誘導されていることがわかった (Figure 3-9)。このことから、MORC3 は、他のアイソフォームについては明らかではないが、少なくとも PML IV を足場として PML body に局在していると考えられる。

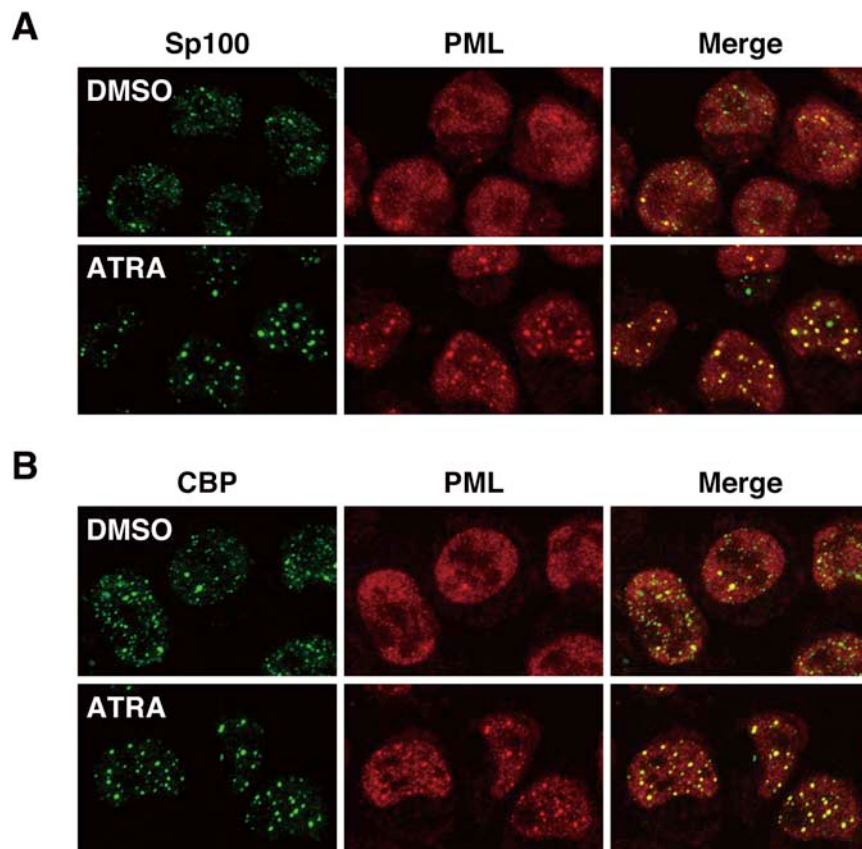


Figure 3-6 NB4 cellにおけるSp100とCBPの局在

NB4 cellを1 μ M ATRA存在下 (ATRA、下図) でまたは非存在下 (DMSO、上図) で3日間処理した後、抗PML抗体 (PG-M3) と、抗Sp100 (A)、または抗CBP (B) 抗体で共染色を行った。

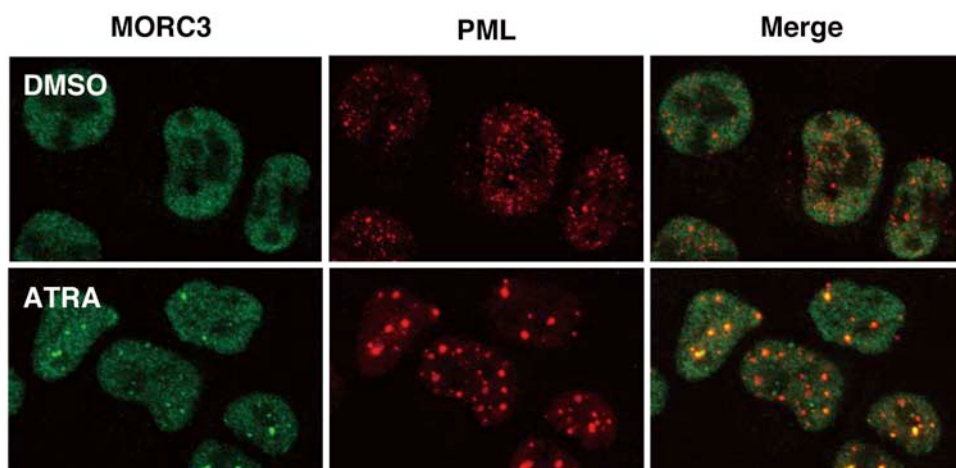


Figure 3-7 NB4 cellにおけるMORC3の局在

NB4 cellを1 μ M ATRA存在下 (ATRA、下図) でまたは非存在下 (DMSO、上図) で3日間処理した後、抗MORC3抗体 (17A9) と抗PML抗体 (H-238) を用いて共染色した。



Figure 3-8 PMLノックダウン細胞におけるMORC3の局在

Saos-2 cell に PML ノックダウンベクターpH1'-shRNA-PML1555-puro をトランスフェクションし、3 日後に抗 MORC3 抗体 (17A9) と抗 PML 抗体 (H-238) を用いて共染色した。

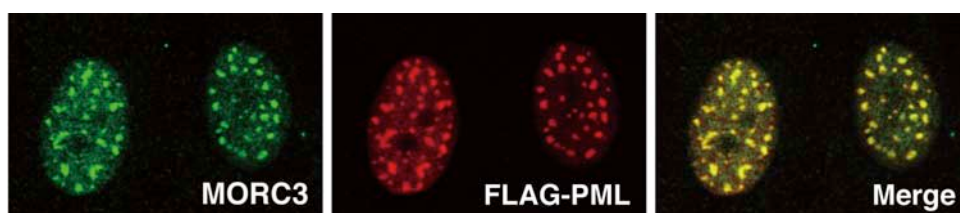


Figure 3-9 MORC3の局在におけるPMLの高発現の影響

WI-38 cell にレトロウイルスを用いて FLAG-PML IV を高発現させ、puromycin による選択終了後 1 日目に抗 MORC3 抗体 (17A9) と抗 FLAG 抗体で共染色した。

3-2-3 MORC3 は ATP 依存的に PML body に局在化する

p53 を活性化しない ATPase 不活性型 mutant、MORC3-E35A についても局在を検討するため、HeLa cell に高発現させたところ、核小体を除く核全体に拡散して存在していることがわかった (Figure 3-10)。また、FLAG-MORC3 を高発現させた HeLa cell から sodium azide と 2-deoxyglucose により ATP を枯渇させると、PML はドットのままであるにもかかわらず、MORC3 は核全体に拡散することもわかった (Figure 3-11)。経過を観察するため EGFP-MORC3 を HeLa 細胞に発現させ、ATP を枯渇させると徐々に拡散していく様子が見られた (Figure 3-12)。このことから MORC3 が PML body へ局在化するのに ATP の加水分解を必要とすることが示唆された。



Figure 3-10 ATPase不活性化mutant、MORC3-E35Aの細胞内局在

HeLa cell に pMEPy-FLAG-MORC3-E35A をトランスフェクションし、抗 FLAG 抗体を用いて免疫染色を行った。

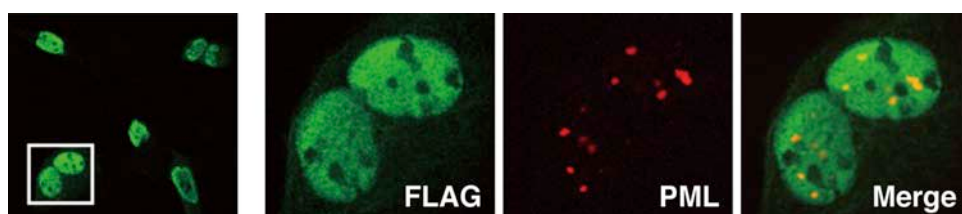


Figure 3-11 ATP枯渇条件下におけるMORC3及びPMLの局在

HeLa cellにpME-FLAG-MORC3-I-Pをトランスフェクションし、puromycinによる選択を行った後、sodium azideと2-deoxyglucoseで30分処理してATPを枯渇させ、固定して、抗FLAG抗体と抗PML抗体 (PG-M3) で免疫染色した。低倍率での蛍光像を左図に示し、四角で囲んだ領域を拡大して、右図に示した。

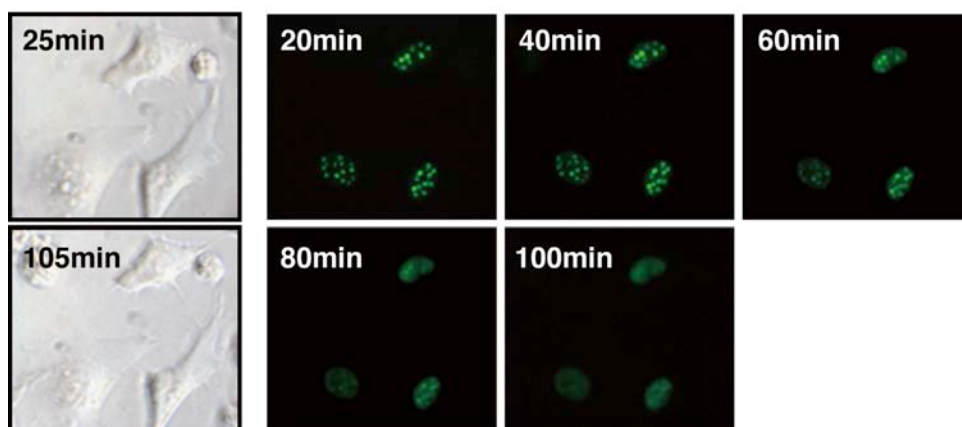


Figure 3-12 ATPの枯渇によるMORC3の局在変化

HeLa cellにpME-EGFP-MORC3-I-PとpME-FLAG-MORC3-I-Pを1:8でトランスフェクションし、puromycinで選択した後、ATPを枯渇させるため、培養液中にsodium azideと2-deoxyglucoseを加え、MORC3の局在変化を経時的に観察した (右図)。左上の数字は処理時間を示す。また、同視野における位相差像を示した (左図)。

3-3 考察

本章では、ヒトおよびマウスの細胞において内在性 MORC3 が核小体を除く核全体、特に PML body に局在していることを明らかにした (Figure 3-1, 2, 3, 4)。しかし、MORC3 の PML body への局在は細胞種によって差が見られ、MEF においては、Saos-2 cell や HeLa cell に比べて数も少なく不明瞭であった。この原因として、MORC3 の PML body への局在化が PML 依存的事であることから (Figure 3-7, 8)、PML 自体の発現量に差がある可能性も考えられるが、免疫染色で確認する限り、PML の発現について細胞間の著しい差は見られなかった。別の可能性としては、PML アイソフォームの構成の違いが考えられる。これまでに、ヒトの初代培養細胞などでは Saos-2 cell や HeLa cell に比べて全 PML のうち PML I の占める割合が高いことが報告されており (Condemine et al., 2006)、MORC3 が PML IV の高発現によって PML body に集積したことを考え合わせると (Figure 3-9)、MORC3 は PML I 以外のアイソフォーム、例えば PML IV などに特異的に相互作用している可能性も考えられる。また本章では、MORC3 が自身の ATPase 活性依存的に PML body に局在化することも示しており (Figure 3-10)、MORC3 の ATPase 活性を制御するような何らかの因子によって、PML body への局在に差がみられた可能性もある。

FLAG-MORC3 を高発現させた場合にも PML body への局在が観察されたが、MORC3 のドットと Sp100 のドットが比較的に一致したのに対し、PML を含まない、あるいは極めて PML の割合が少ないドットがいくつか見られた (Figure 3-5)。MORC3 を高発現させているため、内在性の PML との量的バランスが取れなかったと考えることもできるが、MORC3 のドットの不均一性と捉えることもできる。Sp100 のドットにも PML を含まないものがあることは既に報告されており (Wiesmeijer et al., 2002)、これらのドットは PML を含むドットに比べると極めて速い速度で移動し、その後 PML body に融合する。逆に PML body からは分離しないことから、PML body への局在化の過程とも捉えられるが、今のところこれらの意義は明らかになっていない。

また本章では、ATP の枯渇実験を行い、MORC3 の局在変化を観察した (Figure 3-11, 12)。細胞から ATP を枯渇すると、PML はドット状であるにもかかわらず、FLAG-MORC3 が 30 分以内に拡散したことから、PML body に局在していた MORC3 は核質

に移行したと考えられる。この結果から 2 つの可能性、つまり MORC3 は常に核質と PML body の間を行き来しており、核質から PML body への移行に ATP の加水分解を必要としている可能性と、MORC3 が PML body に維持されるのに ATP の加水分解を必要とする可能性を示している。また、p53 を活性化しない ATPase 不活性型 mutant (Figure 2-3, 5) が核質全体に拡散していたことから (Figure 3-10)、p53 の活性化には MORC3 が PML body へ局在化することが重要であると考えられる。p53 は DNA 損傷などのストレスによって、PML body へと局在化し活性化すると考えられており、MORC3 の PML body への局在化が p53 を PML body へと局在化させるのではないかと予測される。この仮説については、次章で詳細に検討した。

第4章 MORC3による p53 及び Sp100 の局在制御

PML 遺伝子は、スプライシングによって少なくとも 7 つのアイソフォームを産生する。そのうちの 1 つである PML IV は、これらのアイソフォームの中で最もよく研究されており、p53 の活性調節を介してアポトーシスや細胞老化などの誘導に与ることが報告されている (Takahashi et al., 2004)。DNA 損傷や活性型 RAS の高発現が PML の発現を誘導することも報告されており (Bernardi et al., 2004; Pearson et al., 2000)、PML の高発現は次のようなメカニズムで p53 を活性化することが明らかにされている。

1) CBP によるアセチル化を介した活性化

PML ノックアウトマウス由来の MEF では、活性型 RAS の高発現による細胞老化が抑制され、p53 の Lys382 におけるアセチル化の減弱が見られる (Pearson et al., 2000)。さらに、PML IV を高発現させた場合には細胞老化が誘導されることから、細胞老化における PML の重要性が示唆されるが、I、II、III、V では誘導できないことから、PML IV に特異的な機能であることが示されている (Bischof et al., 2002)。PML IV の高発現は、通常では核全体に存在する p53 を PML body へと局在化させ、さらに p53 の Lys382 におけるアセチル化酵素である CBP の局在化も誘導する。しかし、この現象は細胞老化を誘導しない他のアイソフォームによっても起こることから、現在では、p53-PML IV-CBP の 3 分子を含む複合体の形成が p53 のアセチル化を促進し、細胞老化を誘導すると考えられている。またウイルスタンパク IE1 の発現によって PML body が崩壊した状態でも PML IV による細胞老化は誘導されることから (Bischof et al., 2002)、細胞老化の誘導には p53-PML IV-CBP 複合体の形成が重要であり、PML body 自体は必須ではないと考えられている。PML IV はカルボキシル末端に存在する特異的な領域を介して、p53 のコアドメインに直接結合することが示されている。

2) CHK2 によるリン酸化を介した活性化

DNA 損傷チェックポイントにおけるリン酸化酵素である CHK2 は PML body に局在する。PML IV の高発現した細胞に放射線を照射すると、p53 は PML body へと局在化し、CHK2 によって Ser20 のリン酸化を受けることが報告されている (Louria-Hayon et al., 2003)。また放射線照射によって活性化した CHK2 は PML の Ser117 をリン酸化し、p53 非依存的なアポトーシスを誘導することも知られているが (Yang et al., 2002)、そのメカニズムについては未だ明らかではない。

3) HIPK2 によるリン酸化を介した活性化

HIPK2 (homeodomain-interacting protein kinase 2) は PML IV の高発現によって PML body へと局在化し、p53 の Ser46 におけるリン酸化を誘導するが、PML III では局在化は誘導されないことが明らかになっている (Moller et al., 2003)。p53 の Ser46 はマ

ウスでは保存されていないため、このメカニズムはヒトにおいてのみ機能していると考えられる。またヒト p53 を発現した *PML*^{-/-} MEF では HIPK2 の高発現による p53 の Ser46 のリン酸化がほぼ完全に抑制されることが報告されている。

4) MDM2 の隔離による活性化

adriamycin による DNA 損傷によって PML の一部は核小体へ移行することが知られている。それに伴って、p53 の ubiquitin ligase である MDM2 も核小体へと局在化し、p53 から隔離されることで、p53 が安定化しアポトーシスが誘導される (Bernardi et al., 2004)。この現象は DNA 損傷のセンサーであるリン酸化酵素 ATM/ATR の阻害剤、caffeine によって抑制されることがわかっており、また PML IV が ATR の基質であることから、PML が核小体に局在化するには、ATR によって PML がリン酸化を受ける必要であると考えられている。

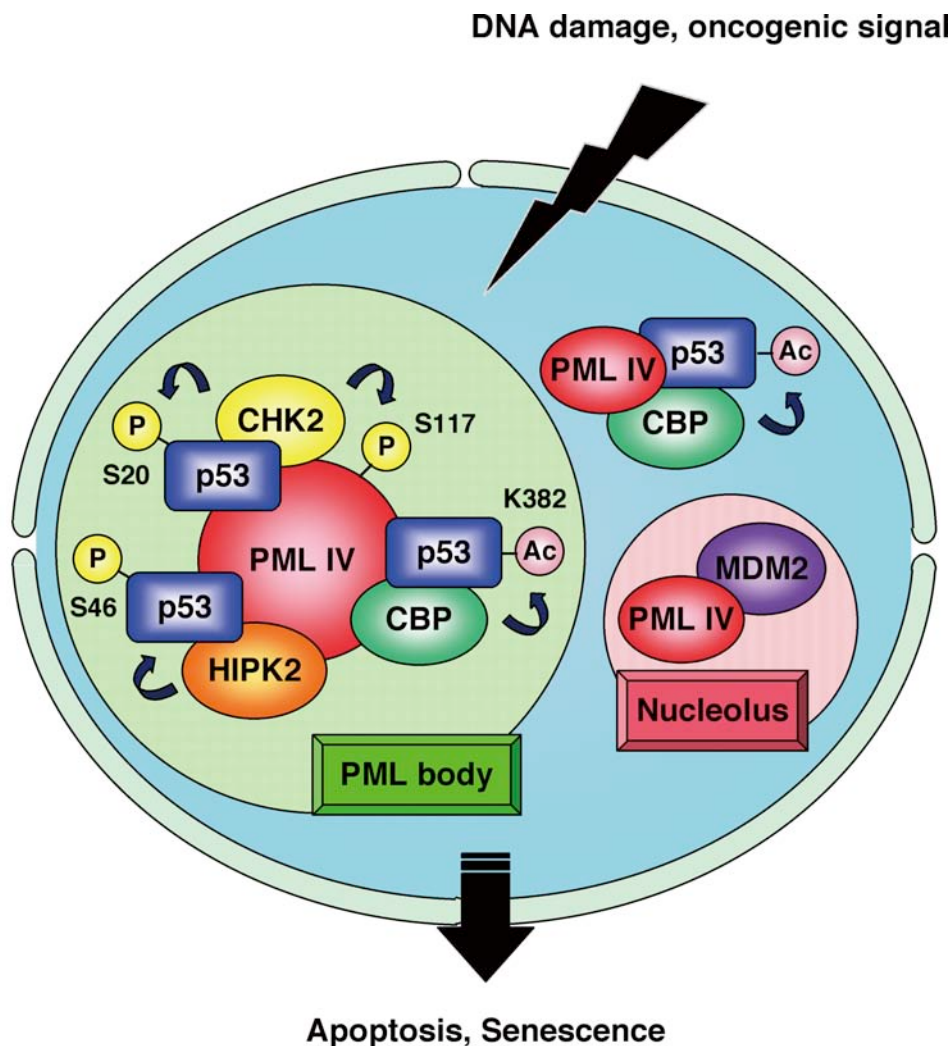


Figure 4-1 PML IVによるp53の活性化メカニズム

本章では、p53のPML bodyへの局在化にMORC3が重要であることを示し、MORC3がp53の局在を制御することで活性を調節している可能性を示した。またp53とは異なり恒常的にPML body に局在することが知られているSp100の局在についても、MORC3の影響を検討した。

4-1 材料と方法

4-1-1 培養細胞

ヒト骨肉腫細胞株 U-2 OS と Saos-2 は McCoy's 5A (Sigma)、ヒト胎児肺由来繊維芽細胞株 WI-38 (RIKEN cell bank) は MEM (Invitrogen)、レトロウイルスの産生用パッケージング細胞株 Plat-A とヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293、ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa は DMEM (Sigma) を用いて 37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。培地には、10%(v/v) 非働化 FBS (Gibco) (Saos-2 のみ 15%)、100U/ml penicillin G potassium (明治)、100mg/ml streptomycin sulfate (明治)を添加した。細胞の回収には、trypsin-EDTA (Gibco) を用いた。

4-1-2 プラスミドの作製

pME-FLAG-MBP (maltose binding protein)-I-P は、pME-FLAG-MORC3-I-P の MORC3 フラグメントを、開始コドン SalI site で置き換えた pMAL (New England Biolabs) 由来の MBP フラグメントに置換することで作製された。pMEPy-HA-MORC3、pMEPy-HA-MBP、pME-HA-PML IV は、それぞれ開始コドン SalI site で置き換えた human MORC3 フラグメント、MBP フラグメントまたは human PML IV フラグメントを pMEPy-HA ベクター、または pME-HA ベクターに組み込み作製された。pMEPy-FLAG-PML IV は開始コドン SalI site で置き換えた human PML IV フラグメントを pMEPy-FLAG ベクターに導入することで作製された。

pH1'-DsRed2-I-P は、まず pDsRed2 (BD Bioscience Clontech) 由来の DsRed2 を pME-I-P ベクターに導入して pME-DsRed2-I-P を作製し、その HindIII-KpnI フラグメントを pH1'ベクターに組み込むことで作製された。MORC3 ノックダウンベクター pH1'-shRNA732-DsRed2-I-P は次のような shRNA 配列を含んでいる。センス鎖、アンチセンス鎖の配列には下線を引いた。

5'-CCCGGGGTACAAGAAGCAGGAAAGTTCAAGAGACTTTCCTGCTTCTT
GTACCCCTTTTTGGAAA-3'

ネガティブコントロールとしては、マウス *Morc3* の同一領域の配列を含む pH1'-shRNA695-DsRed2-I-P を用いた。導入した shRNA 配列を以下に示す。ミスマッチである箇所を小文字で表記した。

5'- CCCaGGGTACAAGAAaCAaGAAAGTTCAAGAGACTTTCtTgtTTCTTGT
ACCCtTTTTTGGAAA-3'

シーケンスと制限酵素処理によって作製した全てのプラスミドの構造が正しいことを確認した。

4-1-3 トランスフェクション

U-2 OS cell と Saos-2 cell は FuGENE 6 (Roche)、HeLa cell には PolyFect (Qiagen) を使い、条件は添付文書に従った。HEK293 cell にはリン酸カルシウム法により遺伝子を導入した。レトロウイルスによる遺伝子導入は 1-1-3 と同様に行った。

4-1-4 細胞の免疫染色

1 次抗体として、mouse monoclonal anti-p53 (DO-1)、rabbit polyclonal anti-CBP (A-22; Santa Cruz)、rabbit polyclonal anti-Sp100 (Chemicon)、mouse monoclonal anti-PML (PG-M3; Santa Cruz)、rabbit polyclonal anti-HA (Sigma)、mouse monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma) または rabbit polyclonal anti-FLAG (Sigma) を、2 次抗体として Alexa Flour 488 (または 594)-coupled donkey anti-mouse IgG (Invitrogen) または Alexa Flour 488 (または 594)-coupled donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen) を用いた。その他の条件は 3-1-4 と同様に行った。Saos-2 cell の透過処理は 0.5% Triton X-100 を含む CSK buffer [10mM PIPES (pH 6.8)、100mM NaCl、3mM MgCl₂、300mM sucrose、Complete, EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche)] で 5 分間行い、その後 4% paraformaldehyde を用いて 4°C で一晩固定し、免疫染色を行った。

4-1-5 免疫沈降

HEK293 cell に pME-FLAG-MORC3-I-P または pME-FLAG-MBP-I-P と pMEPy-HA-MORC3、pMEPy-HA-MBP、pMEPy-HA-p53 または pME-HA-PML IV をトランスフェクションし、puromycin による選択を行った。トランスフェクションから 2 日後に細胞を回収し、1mM dimethyl-3-3'-dithiobispropionimidate-2HCl (DTBP、PIERCE) / PBS を用いて 30 分間室温で攪拌しクロスリンクした。その後、最終濃度が 50mM になるように 1M Tris-HCl (pH8.0) を加えて反応を停止させ、wash buffer [50mM Tris-HCl (pH8.0)、150mM NaCl] で洗浄し、RIPA buffer [50mM Tris-HCl (pH7.4)、150mM NaCl、1% NP-40、0.1% deoxycholic acid (DOC)、0.1% sodium dodecylsulfate (SDS)、1mM EDTA、10mM *N*-ethylmaleimide、Complete, EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche)] に懸濁した。lysate を超音波破碎した後、SDS と DOC を含まない RIPA buffer で 4 倍に希釈し、anti-FLAG M2 affinity gel (A2220, Sigma) を用いて免疫沈降した。溶出は 10% 2-mercapto ethanol (2-ME) を含む 2X sample buffer [125mM Tris-HCl (pH6.8)、4% SDS、50% glycerol、0.02% bromophenol blue]を用いて行い、同時にクロスリンクを切断した。

4-1-6 ウェスタンブロット

1 次抗体として rabbit polyclonal anti-HA (Sigma)、rabbit polyclonal anti-MORC3、mouse monoclonal anti- β -tubulin (TUB 2.1; Sigma) を、2 次抗体として peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG (Sigma)、peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) または peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch) を用いた。その他の条件は 1-1-4 と同様に行った。

4-2 結果

4-2-1 MORC3 は p53 と CBP を PML body に局在させる

MORC3 が p53 の局在に影響するかを調べるため、正常型 p53 を発現する U-2 OS cell に MORC3 を高発現させ内在性 p53 の局在を調べたところ、ほぼ全ての細胞で p53 がドット状を示し、MORC3 と共局在していることがわかった (Figure 4-2、上図)。また *Morc3*^{-/-} MEF において DNA 損傷時の Lys370 と Lys379 のアセチル化が若干減弱していたことから (Figure 2-8)、Lys370 と Lys379 アセチル化酵素である CBP についても検討したところ、CBP も MORC3 と共局在していた (Figure 4-2、下図)。また MORC3 によって細胞老化が誘導される WI-38 cell においても同様の現象が確認され、puromycin による選択終了後 1 日目では 14.3%の細胞で、3 日目には 47.4%の細胞で MORC3 と p53 との共局在が観察された (Figure 4-3、上図)。CBP についてはほぼ全ての細胞で一致していた (Figure 4-3、下図)。これらの結果から MORC3 の高発現が PML と同様に p53 と CBP を PML body へと局在化させることが明らかにされた。

また p53 を活性化しない ATPase 不活性型 mutant、MORC3-E35A についても p53 の局在を調べたが、PML body への局在化は観察されなかった (Figure 4-4、下図)。以上の結果から、MORC3 は p53 を PML body へと局在化させ、活性化を誘導していることが予想される。

さらに MORC3 と p53 あるいは PML との相互作用を検討するため、免疫沈降を行った。HEK293 cell に FLAG-MORC3 と HA-p53 あるいは HA-PML を高発現させ、クロスリンクした後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降したところ、FLAG-MORC3 と共に HA-p53 と HA-PML IV が検出された (Figure 4-5)。また、FLAG-MORC3 と HA-MORC3 の共沈が観察されたことから、MORC3 が分子間で相互作用していることが予想される。

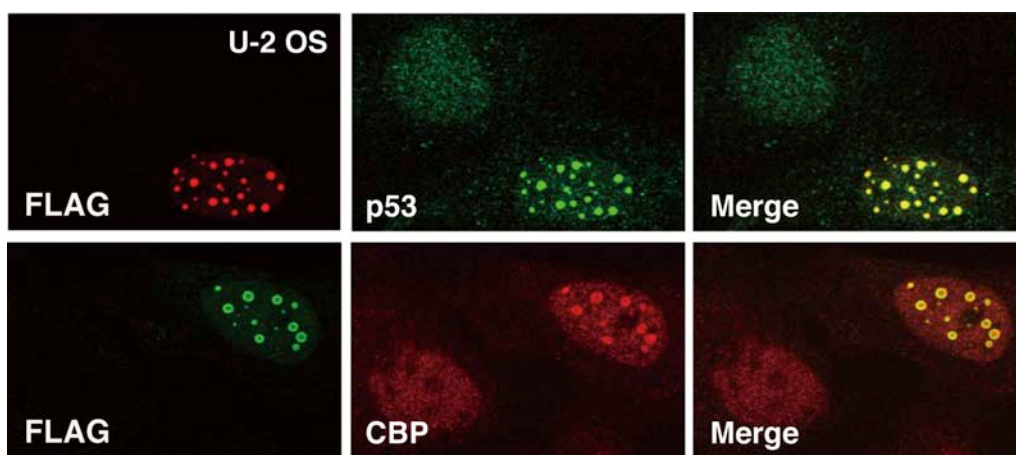


Figure 4-2 MORC3の高発現によるp53とCBPの局在変化

U-2 OS cellにpMEPy-FLAG-MORC3をトランスフェクションし、2日後に抗FLAG抗体と、抗p53 (DO-1) または抗CBP抗体で共染色を行った。

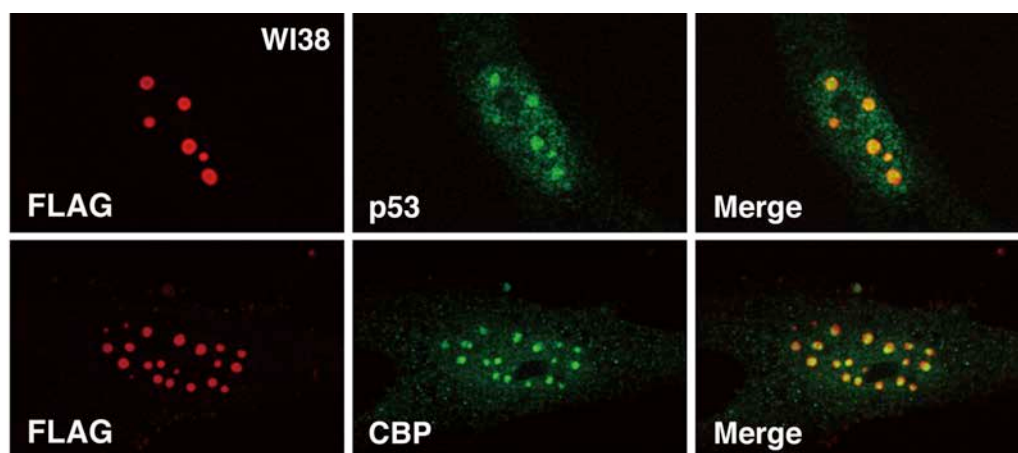


Figure 4-3 MORC3の高発現によるp53とCBPの局在変化

WI-38 cell にレトロウイルスを用いて FLAG-MORC3 を高発現させ、puromycin による選択終了後 1 日目に抗 FLAG 抗体と、抗 p53 (DO-1) または抗 CBP 抗体で共染色を行った。

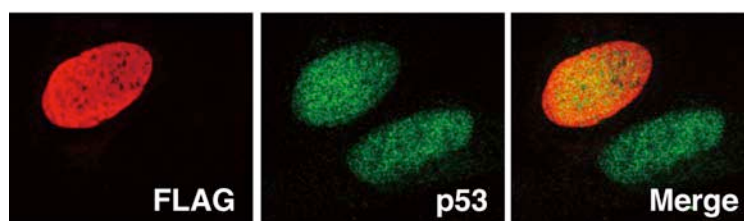


Figure 4-4 MORC3-E35Aの高発現によるp53の局在への影響

U-2 OS cell に pMEPy-FLAG-MORC3-E35A をトランスフェクションし、2 日後に抗 FLAG 抗体と抗 p53 (DO-1) 抗体で共染色を行った。

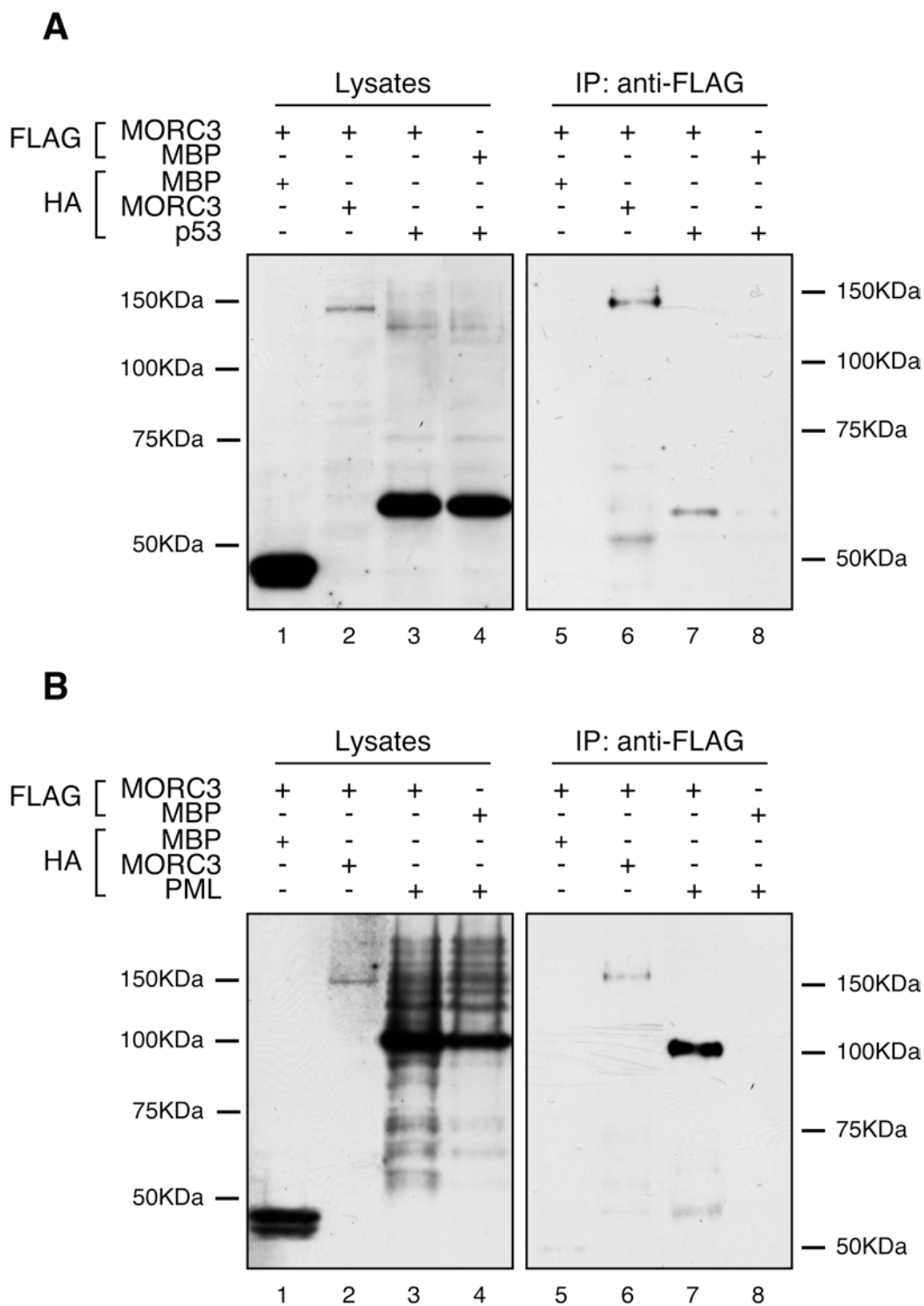


Figure 4-5 MORC3とp53またはPML IVの共沈

HEK293 cell に pME-FLAG-MORC3-I-P または pME-FLAG-MBP-I-P と pMEPy-HA-MORC3、pMEPy-HA-MBP、pMEPy-HA-p53 または pME-HA-PML IV をトランスフェクションし、puromycin による選択を行った後、DTBP を用いてクロスリンクし可溶化して抗 FLAG ゲルで免疫沈降した。lysate は (lane 1, 2, 3, 4) 免疫沈降 (lane 5, 6, 7, 8) に用いた量のそれぞれ 18% (A)、8.7% (B)を泳動した。ウエスタンブロットの 1 次抗体には抗 HA 抗体を用い、二次抗体には lysate (lane 1, 2, 3, 4) の場合は抗ウサギ IgG 抗体、免疫沈降物 (lane 5, 6, 7, 8) の場合は AffiniPure 抗ウサギ IgG 抗体を用いた。溶出には 10% 2-ME を含む 2X sample buffer を用いて行い、同時にクロスリンクを切断した。

4-2-2 MORC3 非存在下では Sp100 および p53 は PML body に局在しない

MORC3 非存在下における p53 や CBP または Sp100 の局在を調べるため、shRNA 法による MORC3 のノックダウンを試みた。HeLa cell に MORC3 ノックダウンベクターpH1'-shRNA732-DsRed2-I-P をトランスフェクションしたところ、MORC3 の発現が効率的に抑制されていた (Figure 4-6)。コントロールベクターpH1'-DsRed2-I-P や、ミスマッチ shRNA ベクターpH1'-shRNA695-DsRed2-I-P では著しい抑制が見られなかったことから、shRNA732 によって MORC3 の発現が抑制されたと考えられる。

そこで、この MORC3 ノックダウンベクターを用いて MORC3 の発現を抑制し、通常は PML body に局在している内在性 Sp100 の免疫染色を行ったところ、41.3%の細胞で Sp100 のドットが 2 個以下に減少しており、拡散する傾向にあることがわかった (Figure 4-7)。Sp100 のドットが 2 個以下の細胞はコントロールベクターでは 5.3%、ミスマッチ shRNA ベクターでは 8.7%であったことから (Figure4-8、A)、恒常的に PML body に局在する Sp100 の局在にも MORC3 が関与することが示唆された。また同時に MORC3 非存在化での PML の局在についても検討したが、著しい変化は観察されなかった (Figure4-8、B)。

さらに MORC3 非存在下における p53 の局在変化についても検討した。p53 欠失細胞 Saos-2 cell に MORC3 ノックダウンベクター、またはコントロールベクターと、pMEPy-HA-p53、pMEPy-FLAG-PML IV をトランスフェクションし、adriamycin で DNA 損傷を与えた後、0.5% Triton X-100 を含む CSK buffer による透過処理を行った。この処理により核質に存在する可溶性 p53 を除去し、PML body に局在化した p53 のみを観察できると考えられる。固定後、HA-p53 と FLAG-PML IV を検出した結果、コントロールベクターを用いた場合には 14%の細胞で p53 が PML body へと局在化していたのに対し、MORC3 ノックダウンベクターでは p53 と PML IV の共局在を観察することはできなかった (Figure 4-9、上、中央図)。また同時に内在性 CBP の局在についても検討したが、CBP はほぼ全ての細胞で、MORC3 の存在、非存在に係わらず PML body に局在していた (Figure 4-9、下図)。この結果は、MORC3 が p53 の PML

body への局在化に重要であることを示しており、4-1-1 の結果と一致する。

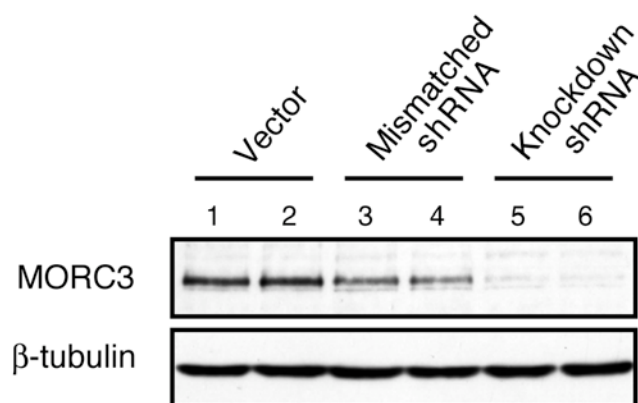


Figure 4-6 shRNAによるMORC3のノックダウン

HeLa cellにpH1'-DsRed2-I-P (lane1、2)、pH1'-shRNA695-DsRed2-I-P (lane3、4)、pH1'-shRNA732-DsRed2-I-P (lane5、6) をトランスフェクションし、puromycinで2日間選択後、抗MORC3抗体あるいは抗β-tubulin抗体を用いてウエスタンブロットを行った。MORC3の発現は、それぞれ独立した2つの試料を用いて検討した。

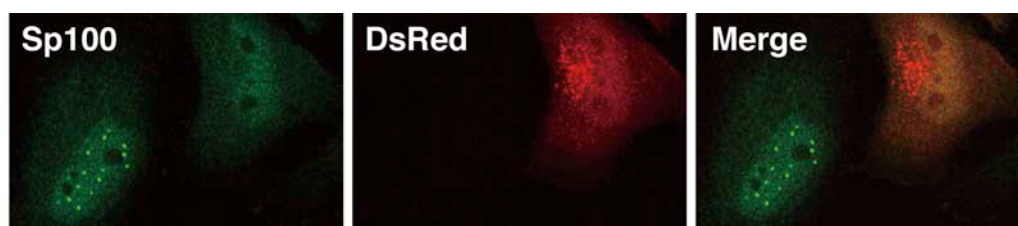


Figure 4-7 MORC3のノックダウンによるSp100の局在変化

HeLa cellにMORC3ノックダウンベクターpH1'-shRNA732-DsRed2-I-Pをトランスフェクションし、puromycinで24時間選択後、抗Sp100抗体を用いて免疫染色を行った。DsRed2を発現している細胞ではshRNAによりMORC3の発現が抑制されていると考えられる。

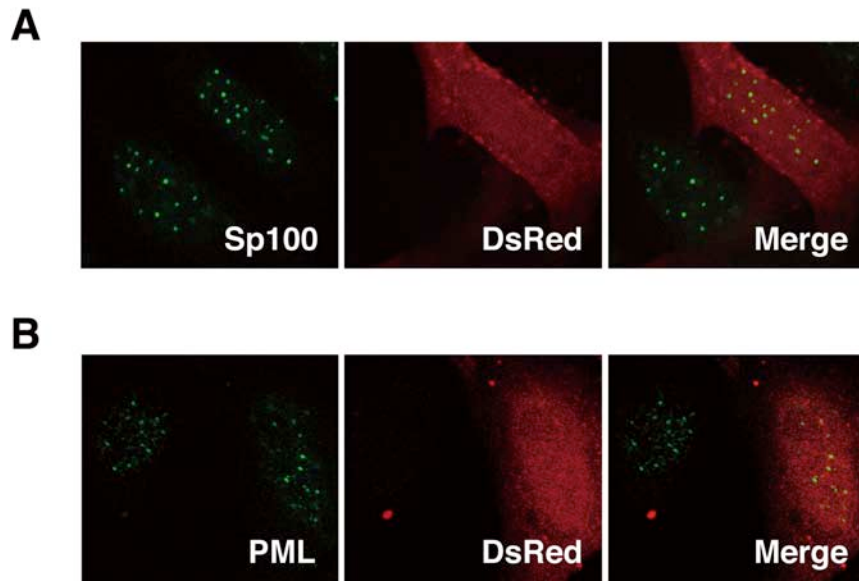


Figure 4-8 MORC3のノックダウンによるPMLの局在変化

HeLa cellにミスマッチshRNAベクターpH1'-shRNA695-DsRed2-I-P (A)、あるいはMORC3ノックダウンベクターpH1'-shRNA732-DsRed2-I-P (B) をトランスフェクションし、puromycinで2日間選択後、抗Sp100抗体 (A) あるいは抗PML抗体 (B)を用いて免疫染色を行った。

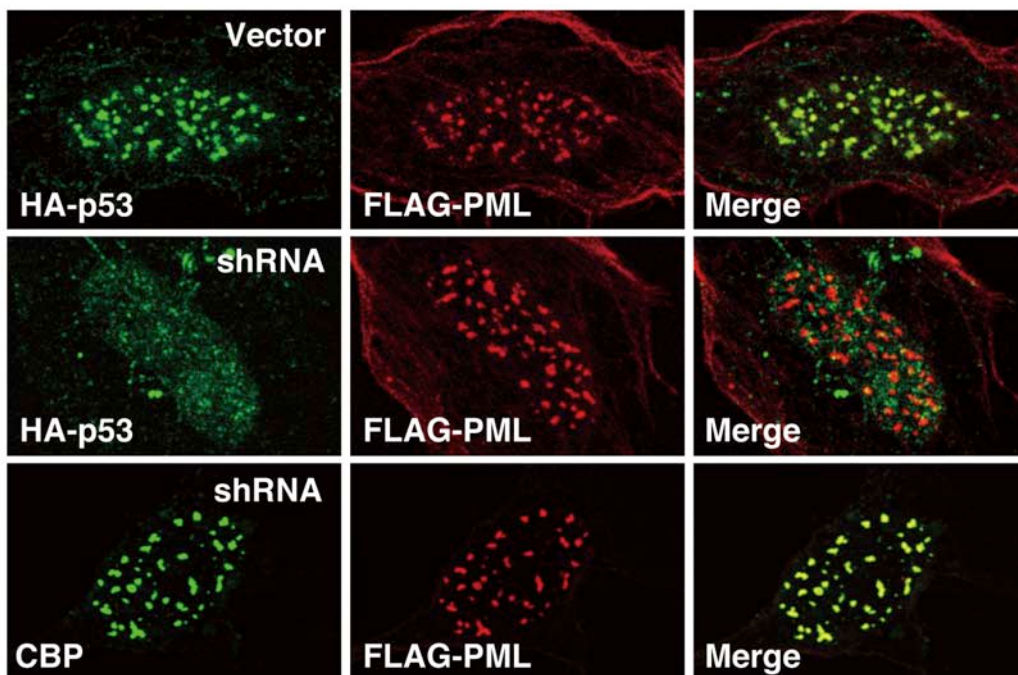


Figure 4-9 MORC3のノックダウンによるp53の局在変化

Saos-2 cellにpH1'-DsRed2-I-P (上図) またはpH1'-shRNA732-DsRed2-I-P (中央、下図) と、pMEPy-HA-p53、pMEPy-FLAG-PML IVをトランスフェクションし、puromycinで2日間選抜した後、1 μ g/ml adriamycinで6時間処理した。その後、これらの細胞を0.5% Triton X-100を含むCSK bufferで透過し、固定して、抗FLAG抗体と抗HA抗体 (上、中央図) または抗CBP抗体 (下図) で共染色した。

4-2-3 ATPase 不活性型 mutant は Sp100 を核内に拡散させる

Sp100 の局在制御における MORC3 の ATPase ドメインの重要性を明らかにするため、HeLa 細胞に ATPase 不活性型 mutant、MORC3-E35A を高発現させたところ、91%の細胞で、内在性 Sp100 が完全に拡散していることがわかった (Figure 4-10、上図)。一方、PML は MORC3-E35A を高発現した細胞でも依然としてドットを形成していた (Figure 4-10、下図)。これらの結果は、MORC3 が ATPase 活性依存的に p53 や Sp100 の PML body への局在化を制御している可能性を示している。

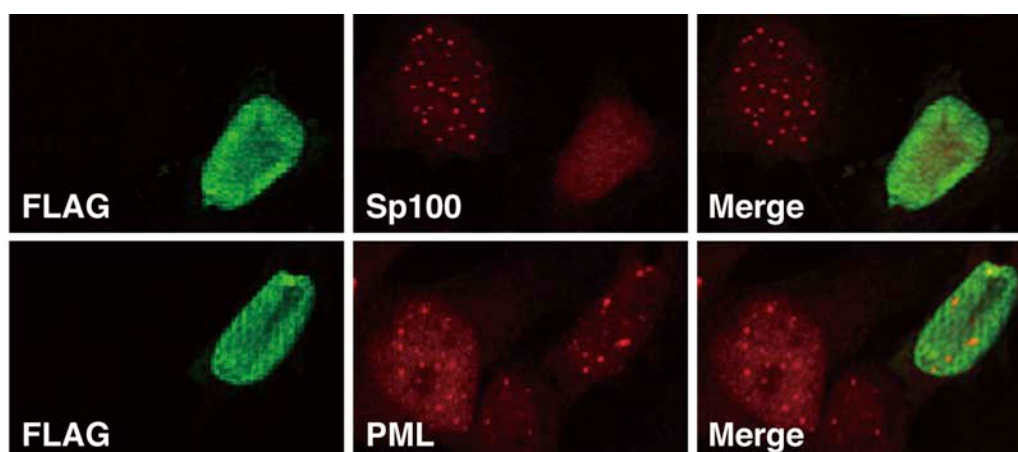


Figure 4-10 ATPase不活性mutantの高発現によるSp100の局在変化

HeLa cellにpMEPy-FLAG-MORC3-E35Aをトランスフェクションし、抗FLAG抗体と、抗Sp100または抗PML抗体 (PG-M3) を用いて共染色を行った。

4-3 考察

本章では、MORC3 の高発現により p53 が核質から PML body へと局在化することを明らかにした (Figure 4-2, 3)。一方、ATPase 不活性型 mutant、E35A は p53 を PML body へと誘導しなかったことから (Figure 4-4)、MORC3 の高発現により p53 の活性化が誘導される一因が、p53 の局在変化にある可能性が示された。同じように p53 を PML

body へと局在化させる PML IV の高発現は、上述したように CBP や CHK2、HIPK2 などによる p53 の修飾を促進することが知られている。しかし、少なくとも今回用いた抗体、および実験系では、MORC3 の高発現による、これらの修飾の促進を観察することはできなかった (Figure 2-7、一部データ非掲載)。逆に、Morc3 非存在下で DNA 損傷により p53 の修飾を促進した場合には、CHK2 による リン酸化部位である Ser20 のリン酸化に著しい差は見られなかったが、Lys370 と Lys379 (ヒトの Lys373 と Lys382 に相当) のアセチル化に若干の減弱が観察され、CBP の関与が予想された (Figure 2-8、9)。そこで、MORC3 の高発現が CBP の局在に及ぼす影響を調べたところ、CBP も p53 と同様に MORC3 の高発現によって PML body へと局在化していることがわかった (Figure 4-2, 3)。このことから、MORC3 の高発現は p53 と CBP を PML body に局在化させることにより、p53-PML IV-CBP 複合体の形成を促進し、p53 の活性化を誘導するのではないかと考えられる。しかし、Morc3 欠失細胞においても CBP によるアセチル化は僅かしか減弱しないことから (Figure 2-8、9)、その他にも活性化を制御するメカニズムが存在することが予想される。MORC3 による p53 の PML body への局在化と活性化の関連についてはさらなる検討が必要であろう。

また p53 の PML body への局在化における MORC3 の重要性を検討するため、shRNA を用いて MORC3 の発現を抑制し、PML IV の発現と adriamycin の刺激によって p53、および CBP の PML body への局在化を誘導したところ、CBP は MORC3 の存在、非存在に係わらず PML body に局在化していたが、p53 は MORC3 非存在下では PML body に局在化しなかった (Figure 4-9)。このことから、MORC3 は、CBP が PML body に局在化するのには必須ではないが、p53 が局在化するためには極めて重要であることが示唆された。

本章では、MORC3 による Sp100 の局在制御についても検討した。shRNA により MORC3 の発現を抑制したところ、通常 PML body に局在する Sp100 が拡散していることがわかった (Figure 4-7)。さらに、MORC3 の ATPase 不活性化 mutant、E35A を発現させた場合にも Sp100 が拡散したことから (Figure 4-10)、MORC3 は p53 のみでなく Sp100 の PML body への局在化にも関与していることが示唆された。Sp100 は常に核内でドット状に局在し停止しているように見えるが、FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) を用いた解析によって、ゆっくりとした速度で PML body に存在する分子を入れ替えていることが明らかにされており (Wiesmeijer et al., 2002)、MORC3 は Sp100 を核質から PML body へと移行させる機構、あるいは Sp100 を PML body に維持する機構に関与しているのではないかとと思われる。

終章

核内には多くのタンパクや DNA が存在しており、これらは外部からの刺激に応答して迅速に相互作用できるように、ある特定の空間に正しく配置されていると考えられる。しかし、核内には、細胞質のように脂質膜で構成された構造体は存在せず、タンパクや DNA が、いかに特定の空間へたどり着くことができるのか、またいかにその空間に維持されるのか、その多くは未だ明らかにされていない。

本研究では、MORC3 が ATPase 依存的に p53 や Sp100 の PML body への局在化を制御していることを明らかにした。これは PML body への局在化が ATP 依存的に制御されていることを分子レベルで示した初めての報告である。

これまでに、核小体に局在する Nucleostemin というタンパクが、GTP 依存的に核小体と核質の間を往復していることが報告されているが、そのメカニズムについてはほとんど明らかにされていない (Tsai and McKay, 2005)。また核内にも actin や、Arp (actin-related protein) などのアクチンファミリータンパクが存在し、クロマチンリモデリング複合体の構成因子として機能していることが知られている (Olave et al., 2002)。これらの機能は未だ明確ではないが、構成因子の集合や核マトリックスへの結合に寄与しているのではないかと考えられている。これらの報告は、核内において複合体や構造体のダイナミクスを制御する分子が存在することを予想させるものであり、非常に興味深い。

MORC3 と同じ GHL ATPase ドメインを持つ Hsp 90 や MutL は、カルボキシル末端側を介して 2 量体を形成している。ATP の結合により ATPase ドメインの存在するアミノ末端側も結合するが、ADP に分解された後に再び解離し、clamp のように動くことで分子構造を変化させる (Ban et al., 1999; Prodromou et al., 2000)。MORC3 はカルボキシル末端側に Coiled-coil ドメインが存在し、免疫沈降により相互作用が確認されたことから、これらのタンパクと同様にカルボキシル末端側を介して 2 量体を形成していることが予想される。ATP の結合と分解による構造変化を介して、相互作用する分子を変えることで MORC3 は PML body と核質を行き来することができるのではないかと考えられる。

MORC3 がどのようなタイミングで PML body に局在化し、また拡散するのか、そしてその時にどのような分子と相互作用しているかを明らかにし、その機能を理解することは、核内における分子の局在化メカニズムの解明に貢献するだけでなく、核内構造を介した転写制御機構の解明という観点からも非常に有益なものになるであろう。

また本研究では MORC3 自身の局在や、p53 と Sp100 の局在制御において ATPase 活性が重要であることを示した。この結果は MORC ファミリータンパクにおける ATPase ドメインの重要性を示唆するものでもある。MORC ファミリータンパクの機

能を明らかにするためには、この ATPase ドメインと、同じく共通して存在する CW ドメインの機能を理解することが必要となるであろう。CW ドメインは保存された 4 つのシステイン残基と 2 つのトリプトファン残基から構成される zinc finger 様のドメインである (Perry and Zhao, 2003)。これまでに 12 のファミリーに存在することが報告されており、これらは全て NLS を有している。このドメインの機能は未だ明らかにされていないが、そのうちの多くが DNA やクロマチンに作用すると思われる別のドメインを持つことが報告されている。これらを考え合わせると MORC ファミリータンパクは ATPase 活性による構造変化を介して、タンパクやクロマチンによって構成される複合体、あるいは構造体への局在化に関与していることが予想される。

実際に、*Morc1* ノックアウトマウスでは、相同組換えに関与する topoisomerase 様タンパク Spo11 が、減数分裂前期において染色体上に局在化できないことが報告されており (Romanienko and Camerini-Otero, 2000)、この可能性が支持される。MORC ファミリータンパクは細胞内において分子の局在化を制御するという共通した機能を持ちながら、組織特異性や非相同領域によってそれぞれに特有の性質を持ち、転写制御や減数分裂といった多様な現象に関与するのではないかと考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、始終適切な御指導、御討論を賜りました大阪府立成人病センター研究所分子遺伝学部門、井上 徳光博士に深く感謝致します。

始終適切な御指導を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞増殖学講座、竹家達夫教授、ならびに北海道大学医学研究科感染症制御学分野、瀬谷司教授に深く感謝致します。

本論文を審査して下さいました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科動物遺伝子機能学講座、川市正史教授、石田靖雅助教授、ならびに遺伝子発現制御学講座、別所康全教授に深く感謝致します。

始終快く御指導、御討論下さいました大阪府立成人病センター研究所分子遺伝学部門、志馬 寛明博士、村上 尚子研究員に深く感謝致します。

大阪府立成人病センター研究所の皆様には、常に暖かく接して頂いたことを深く感謝致します。

2007 年 3 月 高橋桂子

参考文献

- Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J. C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13742-13747.
- Ban, C., Junop, M., and Yang, W. (1999). Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell* 97, 85-97.
- Beausejour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* 22, 4212-4222.
- Bernardi, R., Scaglioni, P. P., Bergmann, S., Horn, H. F., Vousden, K. H., and Pandolfi, P. P. (2004). PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* 6, 665-672.
- Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P. G., and Dejean, A. (2002). Deconstructing PML-induced premature senescence. *Embo J* 21, 3358-3369.
- Bode, A. M., and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4, 793-805.
- Bond, J. A., Webley, K., Wyllie, F. S., Jones, C. J., Craig, A., Hupp, T., and Wynford-Thomas, D. (1999). p53-Dependent growth arrest and altered p53-immunoreactivity following metabolic labelling with ³²P ortho-phosphate in human fibroblasts. *Oncogene* 18, 3788-3792.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A. H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C. A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665.
- Bulavin, D. V., Demidov, O. N., Saito, S., Kauraniemi, P., Phillips, C., Amundson, S. A., Ambrosino, C., Sauter, G., Nebreda, A. R., Anderson, C. W., *et al.* (2002). Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet* 31, 210-215.
- Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513-522.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., *et al.* (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.
- Condemine, W., Takahashi, Y., Zhu, J., Puvion-Dutilleul, F., Guegan, S., Janin, A., and de The, H. (2006). Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms. *Cancer Res* 66, 6192-6198.
- Dellaire, G., and Bazett-Jones, D. P. (2004). PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 26, 963-977.

- Dellaire, G., Ching, R. W., Dehghani, H., Ren, Y., and Bazett-Jones, D. P. (2006a). The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. *J Cell Sci* 119, 1026-1033.
- Dellaire, G., Eskiw, C. H., Dehghani, H., Ching, R. W., and Bazett-Jones, D. P. (2006b). Mitotic accumulations of PML protein contribute to the re-establishment of PML nuclear bodies in G1. *J Cell Sci* 119, 1034-1042.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-9367.
- Dutta, R., and Inouye, M. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* 25, 24-28.
- el-Deiry, W. S. (1998). Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 8, 345-357.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Lin, A. W., Querido, E., McCurrach, M. E., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2002). Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* 22, 3497-3508.
- Hasuwa, H., Kaseda, K., Einarsdottir, T., and Okabe, M. (2002). Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 532, 227-230.
- Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- Ide, T. (2006). [Mechanism of cell proliferation--cell cycle, oncogenes, and senescence]. *Yakugaku Zasshi* 126, 1087-1115.
- Inoue, N., Hess, K. D., Moreadith, R. W., Richardson, L. L., Handel, M. A., Watson, M. L., and Zinn, A. R. (1999). New gene family defined by MORC, a nuclear protein required for mouse spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 8, 1201-1207.
- Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T., Strauss, J. F., 3rd, and Maul, G. G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 147, 221-234.
- Itahana, K., Campisi, J., and Dimri, G. P. (2004). Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 5, 1-10.
- Jacobs, J. J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R. A., and van Lohuizen, M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 397, 164-168.

Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P. S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223-7233.

Kiesslich, A., von Mikecz, A., and Hemmerich, P. (2002). Cell cycle-dependent association of PML bodies with sites of active transcription in nuclei of mammalian cells. *J Struct Biol* 140, 167-179.

Kimura, Y., Sakai, F., Nakano, O., Kisaki, O., Sugimoto, H., Sawamura, T., Sadano, H., and Osumi, T. (2002). The newly identified human nuclear protein NXP-2 possesses three distinct domains, the nuclear matrix-binding, RNA-binding, and coiled-coil domains. *J Biol Chem* 277, 20611-20617.

Li, M., Brooks, C. L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., and Gu, W. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302, 1972-1975.

Louria-Hayon, I., Grossman, T., Sionov, R. V., Alsheich, O., Pandolfi, P. P., and Haupt, Y. (2003). The promyelocytic leukemia protein protects p53 from Mdm2-mediated inhibition and degradation. *J Biol Chem* 278, 33134-33141.

Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.

Moller, A., Sirma, H., Hofmann, T. G., Rueffer, S., Klimczak, E., Droge, W., Will, H., and Schmitz, M. L. (2003). PML is required for homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2)-mediated p53 phosphorylation and cell cycle arrest but is dispensable for the formation of HIPK domains. *Cancer Res* 63, 4310-4314.

Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7, 1063-1066.

Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.

Negorev, D., and Maul, G. G. (2001). Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* 20, 7234-7242.

O'Brate, A., and Giannakakou, P. (2003). The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat* 6, 313-322.

Ohishi, K., Inoue, N., Maeda, Y., Takeda, J., Riezman, H., and Kinoshita, T. (2000). Gaa1p and gpi8p are components of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase that mediates attachment of GPI to proteins. *Mol Biol Cell* 11, 1523-1533.

Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T. J., Stinson, J. A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A. D., Peters, G., and Hara, E. (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* 409, 1067-1070.

Olave, I. A., Reck-Peterson, S. L., and Crabtree, G. R. (2002). Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu Rev Biochem* 71, 755-781.

P, P. K., Bischof, O., Purbey, P. K., Notani, D., Urlaub, H., Dejean, A., and Galande, S. (2007). Functional interaction between PML and SATB1 regulates chromatin-loop architecture and transcription of the MHC class I locus. *Nat Cell Biol* 9, 45-56.

Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W., and Pearl, L. H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *Embo J* 17, 4829-4836.

Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5, 741-747.

Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., and Pelicci, P. G. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207-210.

Perry, J., and Zhao, Y. (2003). The CW domain, a structural module shared amongst vertebrates, vertebrate-infecting parasites and higher plants. *Trends Biochem Sci* 28, 576-580.

Platani, M., Goldberg, I., Lamond, A. I., and Swedlow, J. R. (2002). Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. *Nat Cell Biol* 4, 502-508.

Prodromou, C., Panaretou, B., Chohan, S., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Roe, S. M., Piper, P. W., and Pearl, L. H. (2000). The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *Embo J* 19, 4383-4392.

Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., *et al.* (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *Embo J* 20, 2140-2151.

Romanienko, P. J., and Camerini-Otero, R. D. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* 6, 975-987.

Serrano, M., and Blasco, M. A. (2001). Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 13, 748-753.

Sharpless, N. E., Bardeesy, N., Lee, K. H., Carrasco, D., Castrillon, D. H., Aguirre, A. J., Wu, E. A., Horner, J. W., and DePinho, R. A. (2001). Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413, 86-91.

Sun, P., Yoshizuka, N., New, L., Moser, B. A., Li, Y., Liao, R., Xie, C., Chen, J., Deng, Q., Yamout, M., *et al.* (2007). PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* 128, 295-308.

Takahashi, Y., Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., and de The, H. (2004). PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene* 23, 2819-2824.

Tsai, R. Y., and McKay, R. D. (2005). A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol* 168, 179-184.

Watson, M. L., Zinn, A. R., Inoue, N., Hess, K. D., Cobb, J., Handel, M. A., Halaban, R., Duchene, C. C., Albright, G. M., and Moreadith, R. W. (1998). Identification of morc (microrchidia), a mutation that results in arrest of spermatogenesis at an early meiotic stage in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14361-14366.

Webley, K., Bond, J. A., Jones, C. J., Blaydes, J. P., Craig, A., Hupp, T., and Wynford-Thomas, D. (2000). Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 20, 2803-2808.

Wiesmeijer, K., Molenaar, C., Bekeir, I. M., Tanke, H. J., and Dirks, R. W. (2002). Mobile foci of Sp100 do not contain PML: PML bodies are immobile but PML and Sp100 proteins are not. *J Struct Biol* 140, 180-188.

Yang, S., Kuo, C., Bisi, J. E., and Kim, M. K. (2002). PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat Cell Biol* 4, 865-870.

Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A., and Pandolfi, P. P. (2000a). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95, 2748-2752.

Zhong, S., Salomoni, P., and Pandolfi, P. P. (2000b). The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* 2, E85-90.

Zhu, J., Lallemand-Breitenbach, V., and de The, H. (2001). Pathways of retinoic acid- or arsenic trioxide-induced PML/RARalpha catabolism, role of oncogene degradation in disease remission. *Oncogene* 20, 7257-7265.