原	著
---	---

p300転写コアクチベーターの変異とヒト癌細胞の細胞増殖と転写制御

菅 沼 環

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 顎顔面頸部機能再建学系専攻 顎顔面機構制御学講座 分子発生学分野
(指導：池田正明 助教授)

(2002 年 3 月 15 日受付)

Effect of Mutation in the p300 Transcription Coactivator on Transcriptional Response and Cell Proliferation of Human Carcinoma Cell Lines

SUGANUMA Tamaki

Section of Molecular Embryology, Department of Maxillofacial Biology, Division of Maxillofacial/Neck Reconstruction,
Graduate School of Tokyo Medical and Dental University
(Director: Assoc. Prof. IKEDA Masa-Aki)

The p300 and closely related CBP acetyltransferases function as global transcriptional coactivators and play important roles in a broad spectrum of biological processes, including cell proliferation and differentiation. The p300 protein is targeted by viral oncoproteins, and mutations of the p300 gene associated with second allele inactivation have been identified in certain types of human cancers and carcinomas. This study shows that 300 mutants identified in human carcinoma cells retain the capacity to bind p300/CBP interacting proteins, E1A, PCAF, and Smads. However, carcinoma cell lines expressing only mutant p300 severely impaired transcriptional responses to some signaling, including that of TGF β , which responses have been shown to be mediated by p300 and CBP. Furthermore, tumor-derived p300 mutants did not affect the proliferation of p300-deficient cells in the presence or absence of TGF β . These results suggest that p300 plays an important role in epithelial carcinogenesis by mediating transcription that negatively regulates cell proliferation.

I. 緒 言

p300はDNA腫瘍ウィルスの癌蛋白質が結合する細胞の標的蛋白質としてみつけられた核蛋白質である。p300およびp300と高相同性を示すCBP (CREB-binding protein)は、増殖、分化、アポトーシスといった広範囲な生物学的過程での制御に関連している¹⁻⁴⁾。

p300/CBPはヒストンアセチル基転移酵素 (histone acetyltransferase, HAT) 活性をもち、ヒストンあるいはp53癌抑制蛋白質のような非ヒストン蛋白質のリジン残基をアセチル化する⁵⁾。ヒストンのアセチル化は、クロマチン構造のリモデリングに重要な役割を示すことがわかっている⁶⁾。さらにp300/CBPはさらに他のHATをもつ転

写仲介因子群、P/CAF⁷⁾ やステロイドレセプターコアクチベーター、(SRC)/p160 family proteins⁸⁾ と結合する。またp300/CBP, P/CAFは、HATをもつ核内蛋白質や他のクロマチン関連因子に共通なプロモドメインをもっている⁹⁾。さらに最近プロモドメインは特異的なアセチルリジンに相互作用することが明らかとなった^{10,11)}。したがってプロモドメインはHAT複合体をクロマチンの転写活性化領域に引きつけるアンカーとしての役割を示すことが示唆されている^{12,13)}。

その他にp300/CBPは、塩基配列特異的にDNAに結合するさまざまな転写因子、転写仲介因子、基本転写因子と結合する分子アダプターとして働くことがわかっている^{1,3)}。HAT領域、プロモドメインの他に、p300/CBPに

はさまざまな機能的領域, Cys/His rich regions (CH1, CH2, and CH3), および glutamine (Q)-rich region (図 1 A) があり, 特に CH3/E1A 結合領域は, 多くの転写因子, アデノウイルス E1A 癌蛋白質¹⁴⁾, P/CAF⁷⁾, および基本転写装置を含む種々の蛋白質との結合に必要である。Q-rich 領域は, 多くの転写因子にみられるグルタミンに富んだ転写活性化領域に類似し, SRC/p160 ファミリー蛋白質との結合領域を含んでいる。以上の領域の他に, RAR, CREB のような種々の転写因子と結合する機能的領域も p300 と CBP で共通して保存されている。これらの蛋白質との直接的な相互作用やプロモドメインとアセチル化ヒストンとの結合を通じて, p300/CBP はクロマチン内で大きな転写仲介因子/HAT 複合体をプロモーター近傍にリクルートし, 転写を活性化すると考えられている^{13,15)}。

ラット初代培養細胞を用いた実験で, E1A による p300/CBP の機能の阻害が細胞のトランスフォーメーションに必須であることから, p300 が癌抑制作用をもつことが示唆されてきた。事実, p300 でなく, CBP のヘテロ接合体マウスでは, 造血細胞の腫瘍が生じることが報告されている¹⁶⁾。しかしながら p300 のヘテロ接合体マウスでは腫瘍の発生は認められていない。CBP のヘテロ接合体により発症する Rubinstein-Taybi syndrome (RTS) の患者においても悪性化の発生率が増加する¹⁷⁾。ヒトの腫瘍における p300 の関連については, 正常対立遺伝子の不活性化を伴う p300 の変異が, いくつかの上皮由来の悪性腫瘍, すなわち癌でのみ見つかった¹⁸⁻²⁰⁾。これらの事実は p300/CBP が古典的な癌抑制因子として機能していることを示すとともに, 癌化との関連において, p300 および CBP が細胞特異的な役割をもつことを示唆している。しかしながら, すでに多くの研究が行われている癌抑制遺伝子 Rb, p53 に比較し, ヒト癌化過程における p300/CBP の役割については不明な点が多く残されている。

本研究では正常対立遺伝子の不活性化を伴う p300 遺伝子の変異 (プロモドメインあるいは C 末端-グルタミンリッチ領域の欠失) をもつ 2 つのヒト癌細胞において正常な p300 が癌細胞の増殖を抑制するか, 癌細胞で見つかった p300 変異体は細胞増殖抑制能を失っているかどうかを検討した。さらに p300 のクロマチンリモデリング能や転写仲介能が癌細胞の増殖と増殖抑制に関わる遺伝子の転写の制御とにどのような役割を果たすかを検討した。

II. 方 法

1. 細胞培養

HOC313 口腔扁平上皮癌細胞株, SiHa 子宮頸部癌細胞株, HeLa 子宮頸部癌細胞株, HaCaT ヒト扁平上皮細胞株, COS7 マウス腎上皮細胞株, Mv1Lu ミンク肺上皮細胞株を 10 % ウシ胎児血清 (FCS), 50 μ g/ml ゲンタマイシン

を添加した Dalbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) を用いて, 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ 条件下にて培養した。

2. RT-PCR-SSCP 解析およびシーケンス

次に示すプライマーペア: 5'-TGCAGCCACCCAGAGCCCAG-3' and 5'-GTAGCAGCAGAGGGCAATGAGCTG-3' (コドン 1722-1791), and 5'-GCCACTCCAACGACACCAACTG-3' and 5'-CGTCTCCGCTGCTCTCTGAATC-3' (コドン 1853-1938) を用いて全 RNA から相補 DNA を合成し, 直接シーケンサー (ABI310) により塩基配列を決定した。

3. プラスミド

pcDEFp300 Δ ex15-18 は文献参照²⁰⁾。Flag-tagged p300^{Q1874X} は HOC313 細胞からの cDNA を C2 プライマー²⁰⁾ を用いて PCR 法にて増幅し, 制限酵素を用いて pcDEFp300 の正常 Flag-tag p300 cDNA の対応する断片と入れ替えることにより作製した。pcDEFp300AS は Flag-tag p300 をコードする断片を逆方向に pcDEF3 に組み込むことにより作製した。作製したすべてのプラスミドは塩基配列をシーケンスして確認した。pEFX-p300, p300 Δ ex15-18 および p300^{Q1874X} は, pcDEFp300, p300 Δ ex15-18 および p300^{Q1874X} からの p300 cDNA を pEF4-His vector (Invitrogen 社) に組み込むことにより作製した。Smad3, pDEFp300 および (CAGA)₁₂MLP-Luc は Dr. M. Kawabata および Dr. K. Miyazono から, TK- β REX2-Luc は Dr. K. Umezono から, pGL-CRE-Luc は Dr. M. Hagiwara から, Flag-P/CAF は Dr. Y. Nakatani から, pCMX-hRAR α は Dr. Y. M. Evans から, pRSV-PKA は Dr. R. H. Goodman から供与された。

4. トランスフェクションおよびルシフェレースアッセイ

12 ウェルプレートに一晩培養した細胞に, FuGene6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics 社) を用いてトランスフェクションを行った。内部標準コントロールとしてウミシイタケ発現ベクター pTK-RL (東洋インキ社) を用いた。ルシフェレースとウミシイタケルシフェレース活性はトランスフェクション後 48 時間で測定した。ルシフェレースアッセイの詳細については文献を参照²⁰⁾。ルシフェレース活性はウミシイタケルシフェレース活性にて補正した。

5. 培養細胞の蛋白質抽出液の調整

培養細胞は, PBS にて洗浄後, 氷冷した細胞溶解液 (50 mM Hepes pH 7.9, 250 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1 % NP40, 0.4 mM Na₃VO₄, 10 % glycerol) にて溶解し, 氷中にて 60 分間静置後, 4 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm にて 20 分間遠心を行い, 上清を全細胞抽出液とした。

6. 免疫沈降法 (IP)

E1A, P/CAF および Smad と p300 との場合には, それぞれの遺伝子の発現するプラスミドを COS7 にトランスフェクションし, 48 時間培養後, 全細胞抽出液を調整した。

導入した遺伝子産物を特異的に認識する一次抗体を付加したヒツジ抗マウスあるいは抗ウサギIgG Dynabeads M-280 (Dynal社製) と 4℃で一晩インキュベートした後、ビーズを洗浄液A (20mM Tris-HCl pH 8.0, 250mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5%NP-40) および洗浄液B (20mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5 %NP-40) で各2回洗浄後、Sample loading buffer (2 %SDS, 100 mM DTT, 60 mMTris-HCl pH 6.8, 0.02 %BPB, 10 %Glycerol) を加え、85℃で10分間インキュベートした後、8 % SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。

7. ウェスタンブロット法および抗体

等量の抽出蛋白質にSample loading buffer (2 %SDS, 100 mM DTT, 60 mMTris-HCl pH 6.8, 0.02 %BPB) を加え、85℃で10分間変性した後、6 %SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、PVDF膜 (Immobilon, MILLIPORE社) に転写した。転写後のメンブレンを5 %スキムミルクを含むTTBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 25 mM Tris, 0.1 % Tween 20, pH 8.0) にて室温下で1時間ブロッキングした後、4℃で一晩1次抗体とインキュベートした。用いた1次抗体は以下のとおりである：抗p300 (N-15), 抗p300 (C-20), 抗CBP (C-20) (SantaCruz社) ウサギポリクローナル抗体, 抗Flag M2, 抗Myc (Sigma社), 抗E1A M73 (SantaCruz社), 抗Xpress (Invitrogen社) マウスモノクローナル抗体。2次抗体はHorseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギまたは抗マウスIgG抗体 (Amersham Pharmacia Biotech社) を用い、室温で1時間インキュベート後、ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech社) を用いて蛋白質を検出した。

8. IP-HATアッセイ

SiHaおよびHeLaからRIPAバッファー (150 mM NaCl, 1 %NP-40, 0.5 %DOC, 0.1 %SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) にて蛋白質の抽出を行い、抽出液を抗Flag M2抗体で免疫沈降した後、ウェスタンブロットティングとHATアッセイ²¹⁾を行った。HATアッセイの基質として各 2.4 μg のヒストンH3およびH4 (Roche diagnostics社) を用い、135 pmol [¹⁴C]-acetyl coenzyme A (NEN社) を加えて30℃にて1時間インキュベートした。反応液を2枚の12 %ポリアクリルアミドゲルに等量ずつ泳動し、一方はアセチル化されたヒストンをオートラジオグラフィーにて検出し、もう一方はcoomassie brilliant blueにて染色し、反応液中の全ヒストンを確認した。さらにおのおののヒストンに相当するバンドを切り出して、¹⁴Cの取り込み量をシンチレーションカウンターにて測定した。

9. コロニー形成法

これまでの報告に従ってコロニー形成法を行った²²⁾。SiHaおよびHOC313細胞にネオマイシン耐性遺伝子を含

むFlag-tagged p300発現プラスミドをトランスフェクションし、G418存在下 (SiHa 細胞: 500 μg/ml, HOC313細胞: 600 μg/ml) で約3週間培養し、一部のSiHa細胞は2 μg/mlのTGF β1存在下で培養した。G418に耐性を示す細胞集団を50 %メタノール/50 %アセトンにて固定し、形成されたコロニーの数はギムザ染色して計測した。細胞集団内のおおの細胞におけるFlagの発現は抗Flag抗体による染色により調べた。さらに固定24時間前にBrdUを加え、固定後抗BrdUモノクローナル抗体にて染色し、BrdUの取り込みを確認した後、抗Flag M2抗体にて染色した。結合した抗体の検出にはHistoMark BLACK horseradish peroxidase reporter reagent (KPL社) を用いた。

Ⅲ. 結 果

1. HOC313口腔癌細胞におけるp300遺伝子の突然変異の検出

SiHa子宮頸部癌細胞株における正常p300遺伝子の欠失とプロモドメインの欠失をもたらしエクソン15-18の欠失変異 (p300 Δ ex15-18) はすでに報告されている²⁰⁾。ヒト癌細胞におけるp300遺伝子の変異をさらに調べるために、10株のヒト口腔扁平上皮癌細胞株についてp300cDNAのコーディング領域をほぼカバーする22種類のプライマーセットを用いて (RT)-PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP) 解析を行った。その結果、ヒト口腔扁平上皮癌 HOC313 細胞において2種類のプライマーによるPCR産物が正常と移動度の異なることを見いだした。これらPCR産物は野生型p300mRNAの発現を示す正常な移動度をもつバンドを欠いていたため、直接塩基配列の決定を行った。その結果、HOC313細胞株のp300遺伝子に、E1A結合領域内のコドン1780にミスセンス変異 (CCC→GCC; Pro→Ala) と、コドン1874にナンセンス変異 (CAG→TAG; Gln→stop) の2つの突然変異があることがわかった。さらにこれらPCR産物には正常な塩基配列は認められなかった。コドン1874のナンセンス変異は541アミノ酸の欠失を生じ、この結果生じるp300蛋白質はQ-rich領域を含むC末端を欠く変異 (p300^{Q1874X}) であることがわかった。ウェスタンブロットティング法でHOC313, SiHaおよびHeLa細胞のp300蛋白質を解析したところ、HOC313細胞においてN末端を認識するp300 (N-15) 抗体でのみ欠失した蛋白質が検出された。一方CBPのサイズは、他の2つの細胞と変わらなかった。またHOC313とSiHa細胞においては、ともに正常p300蛋白質の発現は認められなかった。したがって以上の結果から、HOC313細胞は正常対立遺伝子の不活性化を伴う変異であることを示している。しかしながら、サザンブロットティング法ではHOC313細胞のp300遺伝子に大きな変異や欠失は認められなかった (データ未発表)。したがってHOC313細胞に

図1 HOC313細胞およびSiHa細胞におけるp300遺伝子の変異

A. 野生型および変異p300の構造

p300蛋白質の機能的領域：Cys/His-rich領域（CH1, CH2, およびCH3）, bromodomain, HAT領域（HAT）, E1A結合領域（E1A）, SRC/p160結合領域, Q-rich, Smad結合領域（SID-1およびSID-2）を示す。数字は境界のアミノ酸残基を示す。矢印はHOC313細胞におけるコドン1780における変異を示す。

B. HOC313細胞からのRT-PCR産物の塩基配列

矢印は点突然変異を示す。野生型p300は、正常扁平上皮細胞に由来する。

C. HOC313細胞およびSiHa細胞における変異型p300蛋白質

HeLa, HOC313およびSiHa細胞におけるp300の発現を、ウェスタンブロッティング法により解析した結果を示す。用いた抗体は抗p300（N-15）（左）、抗p300（C-20）（中央）および抗CBP（C-20）（右）抗体である。

図2 変異型p300とアデノウイルスE1A癌蛋白質,あるいはP/CAFとの結合

A. COS7細胞にXpress-p300, pCMV-E1Aを図に示すように導入し, 全細胞抽出液を抗E1A抗体を用いて免疫沈降し, 抗Xpress抗体 (上段) あるいは抗E1A抗体 (下段) を用いたウェスタンブロッティング法により, 変異型p300とE1A蛋白質との結合を解析した結果を示す。

B. COS7細胞にXpress-p300, Flag-P/CAFを図に示すように導入し, 全細胞抽出液を抗Xpress抗体を用いて免疫沈降 (IP) し, 抗Flag抗体 (上段) あるいは抗Xpress抗体 (下段) を用いたウェスタンブロッティング法により, 変異型p300とP/CAFとの結合を解析した結果を示す。

においてp300対立遺伝子の発現が求められない理由については明らかでない。

2. p300の変異によるHAT活性への影響

腫瘍で見つかったp300の変異蛋白質 (p300 Δ ex15-18およびp300 $_{Q1874X}$) がp300の機能にどのような影響を及ぼすのかを調べるために, Flag-tagあるいはXpress-tagを付加したp300発現ベクター (pCDEF-p300 and pEFX-p300) (図1) に以上の変異を導入したベクターを作製した。

まず, p300 $_{Q1874X}$ のE1A結合領域におけるミスセンス変異がE1AあるいはP/CAFとの結合に影響するかをIP-ウェスタン法で調べた。Xpress-tagを付加したp300発現ベクターおよびE1A発現ベクターを導入したCOS7細胞の全細胞抽出液を, 抗E1Aマウスモノクローナル抗体で免疫沈降

し, 抗Xpress抗体を用いてウェスタンブロッティング法を行った。その結果, すでに報告されているp300におけるE1A結合領域を欠いたp300 Δ 30は, E1Aと結合しなかった。しかしp300 $_{Q1874X}$ とp300 Δ ex15-18はともにE1Aと結合することがわかった (図2 A)。さらに, p300の同領域に結合するP/CAFとの結合について, Xpress-tagを付加したp300発現ベクターおよびFlag-tagを付加したP/CAF²¹⁾を導入したCOS7細胞の全細胞抽出液を, 抗Xpress抗体で免疫沈降し, 抗Flag抗体にてウェスタンブロッティング法を行った。その結果, p300 $_{Q1874X}$ とp300 Δ ex15-18はともにP/CAFと結合することがわかった。

次にp300 Δ ex15-18におけるプロモドメインの欠失が, HAT活性に影響を与えているのかをIP-HATアッセイ²¹⁾にて調べた。SiHaおよびHeLa細胞における内在性のp300およびCBPを免疫沈降し, 免疫沈降物のHAT活性を比較した。SiHa細胞の内在性p300のHAT活性はCBP HAT活性の38%しか示さなかった。一方, HeLa細胞では大きな差は認められなかった (図3 BおよびC)。したがって, p300 Δ ex15-18は本来のp300のHAT活性の顕著な低下を導くことが示された。

3. 正常p300による細胞増殖の抑制

癌抑制遺伝子Rbおよびp53は変異によって正常両対立遺伝子をとともに失っている癌細胞に導入すると細胞増殖を抑制することが示されている。そこで, SiHaおよびHOC313細胞に野生型p300遺伝子を導入すると増殖が抑制されるかをコロニー形成法にて調べた。ネオマイシン耐性遺伝子をもつFlag-tag p300プラスミドあるいはコントロールプラスミド (pDEFp300AS) をSiHaあるいはHOC313細胞にトランスフェクトし, 3週間後にG418耐性コロニー数を測定した。両方の細胞株で野生型p300の導入によりコロニーの形成が対照の30%に抑制されたが, 両細胞株で見つかったp300変異体 (p300 Δ ex15-18およびp300 $_{Q1874X}$) では抑制は認められなかった (図4 AおよびB)。これら細胞の増殖抑制が導入したp300遺伝子の発現によるものであることを確認するために, 抗Flag抗体を用いた免疫染色法にてコロニーを染色した。p300変異体を導入したSiHa細胞の核において明らかな染色が認められた (図4 C下段)。しかしながら, 野生型p300をトランスフェクトしたプレートで出現した肉眼で確認できる大きさのコロニーではFlag抗体での染色は認められなかった。したがってこれらの細胞では導入した野生型p300が発現していないことを示している (図4 C上段左)。以上の結果はHOC313細胞でも同様であった。一方, 野生型p300を導入したFlag陽性SiHa細胞は20細胞以下の小さな細胞集団にとどまっていた。HOC313細胞では野生型p300を導入したFlag陽性細胞が認められなかったため, 野生型p300の

図3 SiHaおよびHeLa細胞における内在性p300およびCBPのHAT活性

A, B, C. SiHaおよびHeLa細胞の抽出液を抗p300 (N-15) 抗体あるいは抗CBP (C-20) 抗体で免疫沈降し、ウェスタンブロットリング法 (A) およびHATアッセイ (C) にて解析した。抗p300 (N-15) 抗体: A, 上段。抗CBP (C-20) 抗体: A, 下段。IP-HATアッセイは、ヒストンH2A, H2B, H3およびH4を基質として用い、 ^{14}C acetyl-CoAと反応させた後、SDS-ポリアクリルアミドゲルに泳動した。Coomassie Brilliant blueでヒストンを染色したものをBに示す。アセチル化ヒストンを視覚化したものをCに示す。おのおののヒストンに取り込まれた ^{14}C の量をシンチレーションカウンターにて測定し、各細胞におけるCBPに対するp300のHAT活性をRatioとしてC下段に示す。

導入後早い時期 (10日後) に染色した。その結果, 1 ~ 5 個の細胞からなるFlag陽性細胞が認められた (図4 D)。以上の結果は正常p300を欠失した細胞への野生型p300の発現が, 細胞増殖を抑制すること, さらにこの抑制にはプロモドメインとQ-rich領域が必要であることを示している。

Rbを欠失した細胞にRbを導入すると扁平で大きな細胞への形態変化が誘導されることがすでに示されている。野生型p300の発現したHOC313細胞は大きく扁平な形態変化を呈していた (図4 D左)。SiHa細胞ではもとの細胞と扁平な細胞とが混在していることが観察された (図4 C上段

左の矢印)。さらに, 野生型を発現した細胞の増殖能をBrdUの取り込みにより調べると, SiHa細胞では野生型を発現したほぼすべてのコロニーに少なくとも一つのBrdU陽性細胞が含まれていたのに対し, HOC313細胞ではBrdUの取り込みは認められなかった。以上より, 野生型p300の発現はHOC313の増殖停止に十分であるが, SiHaでは増殖を完全に停止するには十分でないことが示された。

4. RARおよびCREBの転写活性におけるp300の変異の影響

p300の細胞増殖抑制の機序を調べるために, p300によって制御されているプロモーターの活性を検討した。すでにp300の両対立遺伝子を欠くノックアウトマウスの繊維芽細胞を使ったレポーターアッセイで, p300はレチノイン酸 (retinoic acid receptor, RAR) によって活性化されるプロモーターの応答には必須だがcAMP-responsive element (CRE) binding protein, CREBの応答には必須ではないことが示されている²³⁾。そこで, プロモドメインあるいはQ-rich領域を欠失が, RAR, CREBの転写応答に影響を与えるのかどうかを調べるために, レチノイン酸レセプターの結合領域をもつレポータープラスミドRAR α 2-LucおよびCREBの結合領域をもつpGL-CRE-Lucのレポーターアッセイにて調べた^{37,38)}。SiHaおよびHOC313細胞ではともにRARに対する応答能が認められた (図5 A)。一方, CREBの反応についてはSiHa細胞ではCREBを活性化するPKAおよびフォスコリン依存的に転写活性の上昇が認められたが (図5 B), HOC313細胞では反応性が失われていた (図5 C)。そこで野生型p300の再導入によりCREBの反応性が回復されるかを調べた。その結果, 野生型p300の導入では5倍のPKAおよびフォスコリン依存的活性が認められたが, 変異型p300 (p300^{Q1874X}およびp300 ^{Δ ex15-18}) の導入では活性化は認められなかった (図5 D)。以上の結果は, p300の変異はRARに対する転写機能に影響しないが, CREBの反応性には影響を与えることを示している。p300 ^{Δ ex15-18}がHOC313細胞においてCREB活性を失っていることから, SiHa細胞ではCBPがCREB活性を仲介していることが示唆された。

5. 野生型p300によるTGF β に対する反応性の回復

Transforming growth factor β (TGF β) は, 上皮系細胞において細胞増殖を抑制的に制御する。p300は転写因子SmadとTGF β 依存的な相互作用をすることによりTGF β のシグナル伝達を仲介する^{24,25)}。そこでわれわれはp300の変異がTGF β に対する反応性に影響を与えているかどうかをレポーターアッセイにて調べた。レポーターにはSmad DNA結合配列を12カ所備えた (CAGA)¹² MLP-Luc²⁶⁾ を用い, TGF β シグナルを活性化するために活性型TGF β type Iレセプター, T β RI (TD) を用いた。正常p300を失っている癌細胞とTGF β に対する反応性を

図4 p300による癌細胞の増殖抑制

SiHa, HOC313およびHeLa細胞に2.5 μ gのpDEFp300ASあるいはpDEFp300を35mmプレートに図に示すように導入し、翌日2枚の100mmプレートにスプリットした。G418を含む培地で約3週間培養後、Giemsa染色し、コロニーの数を計測した。

A. 3週間培養後のSiHa細胞のプレートの写真

B. 野生型p300によるコロニー形成の抑制

データは、少なくとも3回の独立した実験のコロニー数の平均値を示す。SiHa細胞では780個、HOC313細胞では114個のコロニー数を100%とした。

CおよびD. SiHa細胞 (C) およびHOC313細胞 (D) において安定に導入したFlag-p300蛋白質の発現

野生型あるいは変異型Flag-p300を導入したSiHa細胞 (導入後3週目, C) とHOC313細胞 (導入後10日目, D) を抗Flag抗体で染色し、Flag陽性の細胞をDAB染色にて可視化した結果を示す。矢印は、扁平で大きい形態の細胞を示す。

E. p300を安定して導入したSiHa細胞のBrdUの取り込み

安定してFlag-p300を導入して3週間後のSiHa細胞のBrdUの取り込み (24時間) を示す。コロニーを固定後、抗BrdU抗体にて染色し、続いて抗Flag抗体にて染色した。免疫染色はDABにより可視化した。矢印はBrdU陽性細胞を示す (スケールバー=100 μ m)。

比較するために、TGF β に反応することがすでに報告されている上皮由来細胞株、Mv1LuとHaCaT細胞を対照として用いた²⁷⁾。SiHa, HOC313細胞ではT β R-I (TD) の発現で2倍の活性化しか認められなかった。一方、Mv1LuとHaCaT細胞ではそれぞれ37および14倍の活性化がみられた (図6 A, BおよびC)。さらにSiHaとHOC313細胞へ野生型p300を再導入するとTGF β の量依

存的に8倍から11倍の活性化が認められた (図6 BおよびC)。さらに、両細胞においてp300 $_{Q1874X}$ はTGF β に反応するレポーターの転写活性化能を完全に喪失していた。プロモドメインを欠失しているp300 Δ ex15-18は正常に比べ転写活性化能の低下がみられた。p300 Δ ex15-18のHAT活性が*in vitro*で低下していたことから (図3), p300のHAT活性がこの転写に必要なかを調べるために、HAT領域を欠く変異

図5 レチノイン酸およびCREBに対するSiHaおよびHOC313細胞の反応性

- A. SiHaおよびHOC313細胞に0.25 μ gのTK- β REx2-Luc, 0.15 μ gのpCMV-hRAR α を導入し, 9cis-レチノイン酸 (10^{-6} M) にて24時間刺激後, レポーター活性を調べた。
- B. SiHa細胞に0.35 μ gのpGL-CRE-Luc, 0.1 μ gのPKA発現プラスミド (prsv-pka) を導入し, Forskolin (10^{-6} M) にて2.5時間刺激した後, レポーター活性を測定した。
- C. HOC313細胞にBと同様な測定を行い, さらに0.8 μ gの野生型p300を導入した。
- D. 野生型あるいは変異型p300 (0.2, 0.4, 0.8 μ g) を導入し, Cと同様な測定を行った。
- 相対的なルシフェラーゼ活性を示している。1回の実験は2回同時に行い, 独立した3回の実験の平均値を示す。

体, p300 Δ HATを作製し, 活性を調べた。その結果, HAT領域を欠くとTGF β 依存性の転写活性化能がほぼ完全に失われることがわかった (図6C)。このことはp300のHAT活性がTGF β シグナリングに必須であることを示している。さらにSiHa細胞はTGF β への反応性をほぼ失っているため, p300 Δ ex15-18の一過性の過剰発現によるレポーターアッセイ系では, クロマチンとの相互作用に役割をもつプロモドメインの生理的な機能が反映されなかったと考えられる。以上の結果は, 正常p300を欠く細胞がTGF β への反応性を喪失し, 野生型p300の発現はこの喪失した機能を回復させることを示している。

p300^{Q1874X}はSmad結合領域SID1とSID2との間に終止コドンをもつため, C末端側のSID2を欠いている (図1A)²⁸⁾。そこでSID2の欠失がSmad3との結合に影響するかどうかを酵母を用いたツーハイブリッドアッセイ (yeast two hybrid assay) にて調べたところ, p300^{Q1874X}はSmad3とは結合しないことがわかった (未発表データ)。しかしながら, COS7細胞にFlag-tag p300^{Q1874X}と6Myc-tag Smad3を発現させ, IP-ウェスタン法で調べた結果, p300はSmad3とTGF β 依存的に結合した (図6D)。しかし, その結合は野生型よりも弱くなっていた。またp300^{Q1874X}はSmad2とも結合した (未発表データ)。これらの結果は, *in vivo*

図6 SiHaおよびHOC313細胞におけるp300によるTGFβ反応性の回復

- A. HaCaTおよびMv1Lu細胞に0.3 μgの(CAGA)₁₂MLP-Lucレポータープラスミドと、0.1 μgのTβR-I (TD) を導入し、ルシフェーゼ活性を測定した。
- B. HOC313細胞においてA.と同様な実験を行い、さらに野生型p300 (0.4, 0.6 μg) を導入した結果を示す。
- C. 図に示した量 (μg) の野生型および変異型p300の導入を行い、B.と同様な測定を行った。相対的なルシフェーゼ活性を示している。1回の実験は2回同時に行い、独立した3回の実験の平均値を示す。
- D. 変異型p300とSmad3との結合

COS-7に図に示す組み合わせでFlag-p300, Myc-Smad3, TβR-I (TD) 発現プラスミドを導入した。その細胞抽出液を抗Flag抗体にて免疫沈降 (IP) し、抗Myc抗体 (上段および下段, Blot), 抗Flag抗体 (中段, Blot) を用いたウェスタンブロッティング法にて解析した。

ではp300_{Q1874X}がSmadsに結合できること、およびTGFβシグナリングの応答にはp300のQ-rich領域が必須であることを示唆している。これを明らかにするために、SID領域を完全に保持し、Q-rich領域のみが欠失したプラスミドを作製した (p300ΔQ, 図1A)。図6Cに示すようにp300ΔQはTGFβに対する転写活性を失っており、このことはQ-rich領域がTGFβシグナリングを仲介するp300の機能に必須であることを示している。以上の結果から、正常なp300の喪失がTGFβに依存する転写制御に顕著な影響を及ぼすことが結論づけられる。

6. p300によるDNA合成の阻害

次にわれわれは野生型p300の発現がDNA合成を抑制するか、またp300によるTGFβへの反応性の回復が正常p300を欠失している細胞の増殖制御に必要であるかを調べた。HOC313細胞では遺伝子導入効率がきわめて低いため、SiHa細胞を用いた。p300発現プラスミドあるいはコントロールベクターと一緒に遺伝子導入マーカーとしてβ-galactosidase発現プラスミドをエレクトロポレーション法にて導入し、72時間培養後BrdUを4時間取り込ませ、細胞を固定した。抗BrdU抗体とβ-galactosidase抗体による蛍光二重免疫染色により調べた結果、野生型p300の発

図7 一過性あるいは安定的にp300を発現したSiHa細胞におけるTGFβに対する反応性

AおよびB. SiHa細胞にpCMV-βgalとコントロールベクター (pcDEFp300ASあるいはpEF4His vector) あるいはp300発現プラスミドと、Rbあるいはp16発現ベクターを図に示すように導入し、24時間後TGFβ1を2μg/ml加え48時間培養し (固定4時間前にBrdUを加えた)、BrdUを取り込んだβ-gal陽性細胞の数の割合 (%) を示す。データは2回の独立した実験の平均値を示し、1サンプルについて150個の細胞を計測した。

C. TGFβ存在下における野生型p300を導入したSiHa細胞の形態的变化

コントロールベクター (pEF4His vector) あるいはXpress-tag p300発現プラスミドを用いて、コロニー形成法をTGFβ存在下で図4のように行った。細胞は、G418およびTGFβ1を含む培地 (固定前24時間はBrdU存在下) で3週間培養した。コロニーは抗BrdU抗体で染めた後、抗Xpress抗体で染色した。

現はBrdUの取り込みを抑制した (~45%) (図7A)。一方、変異型p300_{Q1874X}を導入した細胞ではDNA合成抑制は認められなかった (図7A)。しかしながらp300_{Δex15-18}過剰発現でTGFβ非存在下でBrdUの取り込みがわずかに (~30%) 抑制された。さらに遺伝子導入後24時間時にTGFβを添加し48時間後のDNA合成の抑制を調べた。しかしながらTGFβはp300のDNA合成抑制能には顕著な影響を示さなかった。これらの結果は、野生型p300の過剰発現がSiHa細胞においてTGFβ非依存的にDNA合成の抑制を起こすことを示している。

一方、癌抑制遺伝子Rbは細胞増殖抑制に重要な役割を示すことが多くの研究で示されている。そこでp300の細胞増殖抑制効果にRbが関係するのかを調べるために、p300とRb、さらにRbのリン酸化を制御する因子であるp16を一過性に共発現させてBrdUの取り込みを測定した。SiHa細胞はRbに対して耐性を示し、同様にp16を単独に発現させてもDNA合成はほとんど抑制されなかった。こ

れは、SiHa細胞がHPV16の感染を受けてRbの機能が阻害されていることと²⁹⁾、Rbの機能を欠く細胞がp16の増殖抑制効果に耐性を示す事実と一致する³⁰⁾。p16はp300と共発現させると、わずかにDNA合成は抑制されたが、Rbとの共発現では全く影響を示さなかった (図7A)。この結果はp300の細胞増殖抑制機能がRbの機能に依存しない機能であることを示唆している。

7. 正常p300の安定な発現に対するTGFβの効果

最後に野生型p300をTGFβ存在下で長期間安定に発現させ、TGFβが正常p300を発現するSiHa細胞に与える影響を調べた。Xpress-tagを発現する野生型、あるいは腫瘍由来の変異型p300 (p300_{Q1874X}またはp300_{Δex15-18}) をSiHa細胞に導入し、TGFβ存在下あるいは非存在下で3週間G418で選択培養した。BrdUを固定24時間前に添加した。その結果、総コロニー数はTGFβの存在下、非存在下で変わらなかった。さらに、TGFβの存在下におけるp300_{Q1874X}またはp300_{Δex15-18}の導入でコロニーの形成は抑

制されなかった（未発表）。次に細胞をまず抗BrdU抗体で染色した後、抗Xpress抗体で染色した。野生型を導入したXpress陽性細胞の形態は扁平で、数個（～5）の細胞集団をなし、BrdU陰性であった（図7C）。一方、TGF β の非存在下では野生型を発現した細胞のうちいくつかの細胞はBrdU陽性であった（図4E左）。変異型p300を発現している細胞、あるいはXpress陰性細胞はTGF β 存在下においてもBrdUを取り込んでいた（図7C下段、未公開）。これらの結果は、TGF β はp300を長期に発現させたSiHa細胞において完全な増殖抑制と形態変化を誘導することを示している。したがって、p300が上皮系細胞の増殖抑制制御に重要な役割を果たすと考えられる。

IV. 考 察

われわれは野生型p300の再導入が正常なp300遺伝子を欠く2種類のヒト癌細胞の増殖抑制を導くことを示した。また最近、ヒト癌細胞において正常対立遺伝子の不活性化を伴うp300遺伝子の変異が報告されている^{18,20)}。以上の事実はp300が癌抑制遺伝子として働くことを示している。

さらに、本研究で正常p300の欠失が、上皮細胞増殖の抑制に重要なTGF β に対する反応^{25,31)}を含む転写制御の異常を引き起こすことを示した。ヒト癌においてTGF β /Smadシグナリング経路に変異が見つかり、またE1A癌蛋白質はp300/CBPとSmadとの相互作用を阻害する^{27,28)}。以上のことからp300の癌抑制能にTGF β に対する転写制御が重要な役割を果たすことを強く示唆している。Rbを欠失した細胞にRbを再導入することで扁平な形態変化と分化を引き起こすことが知られている^{22,32)}。本研究でTGF β が正常p300を長期に導入した細胞の扁平な形態変化を伴う完全な増殖抑制を導くことがわかった。

これまでの一過性の発現系の実験で、p300とCBPはともにSmadと相互作用しTGF β シグナリングを仲介することが示されている。しかしながら、本研究の結果は、上皮細胞においてTGF β 応答性の転写制御にp300が必須であることを示唆している。このことは、p300とCBPとが独立した機能を営むことを示す最近の報告からも支持される^{16,33,34)}。一方、p300あるいはCBP遺伝子を欠損したマウスが胎児致死に至ることは²³⁾、p300とCBPが細胞のなかで量的に限られた因子であることを示唆している。したがって、TGF β 応答性の転写制御はCREBやRARよりも正常p300の変異によるp300/CBPの総量の低下に影響を受けやすいことも推定される。本研究により、癌細胞の増殖抑制と転写制御に必須な役割を果たす少なくとも2つのp300の機能的領域の重要性が明らかとなった。第一に、プロモドメインがこの活性に必須であることを示した。すでにプロモドメインがクロマチンと相互作用することが示されていることから、クロマチンに存在する遺伝子

の転写制御において、プロモドメインが必須の役割を果たすことを強く示唆している。この結果は、p300のプロモドメインがフリーのヒストンでなく、クロマチンのモデルとして用いたヌクレオソムのヒストンのアセチル化に必須であるというKrausらの報告により支持される³⁵⁾。したがってプロモドメインを欠くp300 Δ ex15-18は、p300コアクチベーター/HATが本来担うべきクロマチンに対する作用を欠いているものと考えられる。また、p300 Δ ex15-18がレポーターアッセイにおいて活性を完全に失っていた事実は、プロモドメインの機能が一過性のレポーターアッセイでは正確に反映されなかったと予想される。第二に、本研究はSRC/p160結合領域を含むQ-rich領域がこの増殖抑制能に必須であることを示した。このことはプロモドメインとHAT領域を保持しているが、Q-rich領域およびE1A結合領域を欠くC末端の欠損を引き起こすp300の変異が報告されていることから支持される¹⁸⁾。さらに、プロモドメインを欠くp300 Δ ex15-18はQ-richを欠くp300^{Q1874X}を発現するHOC313細胞の増殖をトランスに抑制することはなかった。同様に、逆にp300^{Q1874X}もp300 Δ ex15-18を発現する細胞の増殖を抑制しなかった。したがって細胞増殖抑制とTGF β 依存性の転写活性を促進するためにはコアクチベーター能とクロマチンリモデリング活性が一つの複合体に含まれていることが必要であることが示唆される。

p53はSiHaおよびHOC313細胞で不活化されている²⁹⁾（Ikeda未発表データ）。したがってこれら2つの細胞でp300による増殖抑制がみられたことはp53の機能の不活性化にp300の変異が関連しない可能性を示唆している。このことは、p300が変異した癌細胞においてもp53が変異しているという最近の知見と一致する¹⁸⁾。さらに、Rbの機能がHPVによって阻害されているSiHa細胞の増殖をp300が抑制するという事は、p300の増殖抑制にはRbの機能を必要としないことを示唆している。しかしながら、野生型p300を導入したSiHa細胞は完全に増殖能を失っておらず、p300はRbの機能を失っている細胞の完全な増殖抑制を導くには不十分であることを示している。本研究でp300は正常なRbが発現しているHOC313細胞の増殖停止を引き起こすことがわかった。したがって、正常なRbの機能が野生型p300を発現させた細胞の増殖停止に必要な可能性は残っている。p300による増殖抑制機序の解明には、さらなる研究が必要である。

V. 結 論

転写仲介因子p300は、遺伝子の転写制御に重要な役割を果たしている。p300が癌抑制遺伝子としての性質をもつ可能性は以前から指摘されており、最近、ヒト癌細胞において突然変異が報告された。しかしながら、細胞癌化に

におけるp300の役割はほとんど明らかにされていない。本研究は、p300のヒト細胞の癌化における役割について解析を行い、以下の結論を得た。

1. 本研究においてヒト口腔癌細胞HOC313株における正常対立遺伝子の欠失を伴うp300遺伝子の変異を見いだした。この変異により、C-末端Q-rich領域の欠失が起こることが明らかになった。
2. HOC313細胞と、先に同定したプロモドメインの欠失をもたすp300を発現するヒト子宮頸部癌細胞SiHa株を野生型を用いて、野生型p300が正常p300を失っている癌細胞の増殖を抑制することを明らかにした。さらに、癌細胞で見つかったp300変異体は細胞増殖抑制能を失っていることを明らかにした。その結果、この抑制能にはp300のプロモドメインとQ-rich領域が必須であることが明らかになった。
3. TGF β に応答する転写活性が、正常なp300を失っている細胞で著しく低下していた。これらの細胞に野生型p300を導入することにより、TGF β への反応が回復された。しかしながら、変異p300はその活性を失っているか、低下を示した。このことから、TGF β に対する転写活性にp300が必須の役割を示すことが示唆された。
4. 以上の結果から、p300が正常p300を欠失した癌細胞の増殖を抑制することが、実験的に初めて示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご校閲を賜りました本学大学院分子発生学分野 江藤一洋教授に深淵なる謝意を表します。また終始、直接ご懇篤なるご教示、ご指導およびご校閲を賜りました本学大学院分子発生学分野 池田正明 助教授に慎んで感謝の意を表します。本研究の遂行に際し、惜しみないご指導、ご協力、および実験材料のご供与をいただきました東京大学医学部分子病理学講座 宮園浩平教授、癌研究所生化学部 川畑正博先生、鶴見大学歯学部口腔細菌学 大島朋子先生に、慎んで深謝申し上げます。最後に、終始温かいご支援をいただきました本学大学院分子発生学分野の諸先生方に厚くお礼を申し上げます。本研究の要旨の一部は、第 41 回歯科基礎医学会総会（1999 年 9 月 24 日、東京）にて発表した。

文 献

- 1) Goodman, R. H. and Smolik, S.: CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes & Development* 14: 1553-1577, 2000.
- 2) Kouzarides, T.: Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Current Opinion in Genetics & Development* 9: 40-48, 1999.
- 3) Shikama, N., Lyon, J. and La Thangue, N. B.: The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *trends in Cell Biology* 7: 230-236, 1997.
- 4) Shikama, N., Lee, C. W., France, S., Delavaine, L., Lyon,

- J., Krstic-Demonacos, M. and La Thangue, N. B.: A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. *Mol. Cell* 4: 365-376, 1999.
- 5) Avantiaggiati, M. L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S. and Kelly, K.: Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* 89: 1175-1184, 1997.
- 6) Struhl, K.: Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* 12: 599-606, 1998.
- 7) Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H. and Nakatani, Y.: A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382: 319-324, 1996.
- 8) Yao, T. P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R. and Livingston, D. M.: The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 10626-10631, 1996.
- 9) Jeanmougin, F., Wurtz, J. M., Le Douarin, B., Chambon, P. and Losson, R.: The bromodomain revisited. *TIBS* 22: 151-153, 1997.
- 10) Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K. and Zhou, M. M.: Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399: 491-496, 1999.
- 11) Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S. and Tjian, R.: Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 288:1422-1425, 2000.
- 12) Cheung, P., Allis, C. D. and Sassone-Corsi, P.: Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103: 267-271, 2000.
- 13) Winston, F. and Allis, C. D.: The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat. Struct. Biol.* 6(7): 601-604, 1999.
- 14) Eckner, R., Ewen, M. E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J. A., Lawrence, J. B. and Livingston, D. M.: Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes & Development* 8: 869-884, 1994.
- 15) Kundu, T. K., Palhan, V. B., Wang, Z., An, W., Cole, P. A. and Roeder, R. G.: Activator-dependent transcription from chromatin in vitro involving targeted histone acetylation by p300. *Molecular Cell* 6: 551-561, 2000.
- 16) Kung, A. L., Rebel, V. I., Bronson, R. T., Ch'ng, L. E., Sieff, C. A., Livingston, D. M. and Yao, T. P.: Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes & Development* 14: 272-277, 2000.
- 17) Giles, R. H., Peters, D. J. and Breuning, M. H.: Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet* 14: 178-183, 1998.
- 18) Gayther, S. A., Batley, S. J., Linger, L., Bannister, A., Thorpe, K., Chin, S. F., Daigo, Y., Russell, P., Wilson, A., Sowter, H. M., Delhanty, J. D., Ponder, B. A., Kouzarides, T. and Caldas, C.: Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nature genetics* 24: 300-303, 2000.
- 19) Muraoka, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Shitara, N., Chong, J. M., Iwama, T. and Miyaki, M.: p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. *Oncogene* 12: 1565-1569, 2000.

- 20) Ohshima, T., Suganuma, T. and Ikeda, M.: A Novel Mutation Lacking the Bromodomain of the Transcriptional Coactivator p300 in the SiHa Cervical Carcinoma Cell Line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281: 569-575, 2001.
- 21) Bannister, A. and Kouzarides, T.: The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384: 641-643, 1996.
- 22) Qin, X. Q., Chittenden, T., Livingston, D. M. and Kaelin, W. G. Jr.: Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes & Development* 6: 953-964, 1992.
- 23) Yao, T. P., Oh, S. P., Fuchs, M., Zhou, N. D., Ch'ng, L. E., Newsome, D., Bronson, R. T., Li, E., Livingston, D. M. and Eckner, R.: Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* 93: 361-372, 1998.
- 24) Derynck, R., Zhang, Y. and Feng, X. H.: Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 95: 737-740, 1998.
- 25) Massagué, J., Blain, S. W. and Lo, R. S.: TGFβ signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295-309, 2000.
- 26) Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. and Gauthier, J. M.: Direct binding of Smad 3 and Smad 4 to critical TGFβ-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *The EMBO Journal* 17: 3091-3100, 1998.
- 27) Pouponnot, C., Jayaraman, L. and Massagué, J.: Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 22865-22868, 1998.
- 28) Nishihara, A., Hanai, J., Imamura, T., Miyazono, K. and Kawabata, M.: E1A inhibits transforming growth factor-beta signaling through binding to Smad proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 28716-28723, 1999.
- 29) Huang, T. G., Ip, S. M., Yeung, W. S. and Ngan, H. Y.: Changes in p21WAF1, pRb, Mdm-2, Bax and Bcl-2 expression in cervical cancer cell lines transfected with a p53 expressing adenovirus. *European J. Cancer* 36: 249-256, 2000.
- 30) Sherr, C. J.: Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677, 1996.
- 31) ten Dijke, P., Miyazono, K. and Heldin, C. H.: Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem. Sci.* 25: 64-70, 2000.
- 32) Sellers, W. R., Novitch, B. G., Miyake, S., Heith, A., Otterson, G. A., Kaye, F. J., Lassar, A. B. and Kaelin, W. G.: Stable binding to E2F is not required for the retinoblastoma protein to activate transcription, promote differentiation, and suppress tumor cell growth. *Genes Dev.* 12: 95-106, 1998.
- 33) Eid, J. E., Kung, A. L., Scully, R. and Livingston, D. M.: p300 interacts with the nuclear proto-oncoprotein SYT as part of the active control of cell adhesion. *Cell* 102: 839-848, 2000.
- 34) Kawasaki, H., Eckner, R., Yao, T. P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D. M. and Yokoyama, K. K.: Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature* 393: 284-289, 1998.
- 35) Kraus, W. L., Manning, E. T. and Kadonaga, J. T.: Biochemical analysis of distinct activation functions in p300 that enhance transcription initiation with chromatin templates. *Mol. Cell Biol.* 19: 8123-8135, 1999.
- 36) Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M. and Evans, R. M.: Role of CBP/p300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383: 99-103, 1996.
- 37) Wolton, K. M., Chrivia, J. C., Rehfuess, R. P., Lochner, Goodman, R. H.: A dominant repressor of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP)-regulated enhancer-binding protein activity inhibits the cAMP-mediated induction of the somatostatin promoter in vivo. *Mol. Endocrinol.* 6: 647-655, 1992.