



Wip1ホスファターゼによるChk2キナーゼ制御機構の構造機能関連解析

徐, 暁洲

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Date of Publication)

2013-03-21

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2940

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002940>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



Wip1 ホスファターゼによる Chk2 キナーゼの 制御機構の構造機能連関解析

徐 暁 洲

神戸大学大学院医学系研究科
応用分子医学講座消化器外科学

連絡先：徐 暁洲
神戸大学大学院医学系研究科
応用分子医学講座消化器外科学
神戸市中央区楠町 7-5-1
電話：078-382-5925
ファックス：078-382-5939

(平成15年12月15日受付)

[要 約]

癌抑制遺伝子産物 Chk2 は核内蛋白質キナーゼであり、DNA 損傷時の細胞応答反応に重要な役割を果たしている。細胞が DNA 損傷を受けると、Chk2 キナーゼは ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) キナーゼによって 68 番目のスレオニンがリン酸化され、活性化する。活性化Chk2 キナーゼは、下流分子 (p53, Cdc25C 等) をリン酸化し、細胞周期の停止やアポトーシスを誘導する。Chk2 キナーゼの共役分子を同定する目的で酵母 2 ハイブリッド法によるスクリーニングを行い、癌抑制遺伝子産物 Wip1 (PPM1D) ホスファターゼを単離した。Chk2 キナーゼと Wip1 ホスファターゼは、*in vitro* 及び *in vivo* において結合し、この結合には Chk2 キナーゼの SQ/TQドメインが必要であることを明らかにした。また、Chk2 キナーゼ発現細胞に Wip1 ホスファターゼを共発現させると Chk2 キナーゼのスレオニン 68 リン酸化が抑制され、Wip1 ホスファターゼによって Chk2 キナーゼが負に制御されることが示唆された。

[緒 言]

細胞は染色体 DNA に傷害を受けるとただちに細胞周期を停止し、その間に傷害 DNA を修復することで損傷 DNA の次世代への蓄積を防ぐ。この細胞周期チェックポイント機構により、細胞は DNA の修復が完了するまで細胞周期の進行を停止し、修復できない

ような損傷の場合は、自身を除去するためにアポトーシスを誘導する。この機構の破綻は癌をはじめとする様々な生活習慣病の発症に関与すると考えられ、この機構の解明には大きな期待が寄せられている。

Chk2 ファミリー (Chk2/Rad53/cds1 ファミリー) は、種を越えて構造の良く保存された核内蛋白質キナーゼであり、DNA 損傷時の細胞周期チェックポイント機構において必須の役割を担うことが明らかとなっている (図1)¹⁾⁻³⁾。Chk2 キナーゼは、DNA 損傷に伴いリン酸化されて活性化し、下流の p53, BRCA1, Cdc25C, PML, E2F-1 といった分子をリン酸化することによって細胞周期やアポトーシスを制御している⁴⁾⁻⁹⁾。さらに、家族性腫瘍の Li-Fraumeni 症候群の患者の中に Chk2 遺伝子座の変異が発見され¹⁰⁾、Chk2 キナーゼが癌抑制遺伝子産物として機能することが示唆されている。

Chk2 キナーゼは、ATM キナーゼによって SQ/TQドメイン内の68番目のスレオニンが直接リン酸化される¹¹⁾⁻¹³⁾。スレオニン68のリン酸化に伴い、キナーゼドメインの活性化ループ部位に存在するスレオニン383, 387に対して自己リン酸化反応が起こり、Chk2 キナーゼは最大限に活性化する¹⁴⁾。この自己リン酸化に関しては、スレオニン68のリン酸化に伴い、SQ/TQドメインとFHA (fork head-associated) ドメインが会合し、2量体を形成することによって自己リン酸化が促進されるというモデルが提唱されている¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。

Wip1 (wildtype p53-induced phosphatase 1, PPM1D) は、PP2Cファミリーに属する核内ホスファターゼで

キーワード：DNA 損傷応答, 細胞周期チェックポイント機構, Chk2 キナーゼ, Wip1 ホスファターゼ

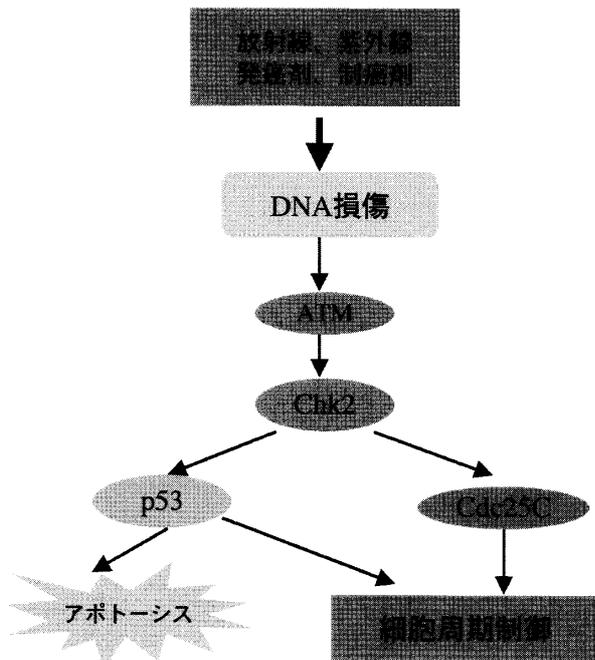


図1 DNA 障害時の細胞周期チェックポイント制御機構の模式図。

あり、DNA損傷時にp53依存的に発現が誘導される分子として同定された¹⁸⁾。近年、細胞の紫外線照射に伴うp38-p53シグナル伝達の活性化によってWip1の発現が誘導され、その結果Wip1がp38を脱リン酸化し不活性化させるという負のフィードバック制御機構が明らかとなった¹⁹⁾。さらに最近、乳癌等ヒトの癌においてWip1 遺伝子の増幅が報告され、Wip1 ホスファターゼが癌遺伝子産物として機能することが示唆されている^{20)~22)}。

本研究では、Chk2キナーゼの新規共役分子を同定するために酵母2ハイブリッド法を用いたスクリーニングを行い、Wip1 ホスファターゼを同定した。構造機能関連解析により、Chk2がWip1とSQ/TQドメインを介して結合し、さらにWip1がChk2のスレオニン68リン酸化を抑制することによってWip1がChk2の活性を負に制御する可能性が示唆された。

[方法]

プラスミドの構築

ヒトChk2遺伝子は、ヒト胎盤由来cDNAライブラリーよりPCR法を用いてクローニングし、pEBGベクター¹⁹⁾に挿入した。さらに各種Chk2変異体をPCR法により作製し、pEBGベクター、pGEXベクター、pGBKT7ベクターに挿入した。Wip1 遺伝子(東京大学武川睦寛博士より供与)はPCR法を用いてpcDNAベクターおよびpGADT7ベクターに挿入した。

酵母2ハイブリッド法

MATCHMAKER system3 (Clontech) を利用し、添付のマニュアルに基づき実験を行った。ヒト胎盤由来cDNAライブラリーを使用し、おとり遺伝子としてpGBKT7-Chk2 (Δ Kinase) を用いてスクリーニングを行った。結合部位の決定には、pGBKT7-Chk2 (WT; Δ SQ/TQ; Δ FHA; Δ Kinase;SQ/TQ;FHA) 及びpGADT7-Wip1 (WT) を用いた。

細胞、抗体及びDNA導入

HEK293T細胞は、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM, Sigma) 及び10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS) を用いて培養した。酵母AH109株は、添付のマニュアルに基づき培養した。

抗HA抗体として、マウスモノクローナル抗体12CA5 (Roche) 及びラットモノクローナル抗体3F10 (Roche) を用いた。抗Flag抗体として、マウスモノクローナル抗体M2 (Sigma) を用いた。さらに抗リン酸化Chk2抗体 (anti-phospho-Chk2 (Thr68), Cell signaling), 抗GST抗体 (Pharmacia Biotech), Alexa Fluor標識抗体 (Alexa Fluor 546 標識抗マウスIgG抗体及びAlexa Fluor 488標識抗ラットIgG抗体, Molecular Probes) を用いた。細胞への遺伝子導入は、リン酸カルシウム法またはリポフェクション法 (Gibco BRL) を用いた。

Glutathione S-transferase (GST) 融合蛋白質の精製、共沈実験及びウエスタンブロット

GST融合蛋白質は大腸菌DH5 α 株内で発現させ、溶解液 (phosphate buffered saline, PBS), 1% (v/v) Triton X-100, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ g/ml ロイペプチン, 10 μ g/ml アプロチニン) を用いて抽出し、グルタチオンビーズ (Pharmacia Biotech) により精製した。pcDNA-Wip1を導入したHEK293T細胞の抽出液をグルタチオンビーズに結合させたGST融合蛋白質と反応させた (4°C, 1時間)。溶解液で5回洗浄後、Laemmli サンプルバッファーで溶出した。

In vivo の結合実験に関しては、遺伝子を導入したHEK293T細胞を溶解液 (50mM Tris-HCl (pH7.4) 0.5%(v/v) NP-40, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM NaF, 1mM Na₂VO₄, 1mM PMSF, 10 μ g/ml ロイペプチン, 10 μ g/ml アプロチニン) を用いて抽出し、グルタチオンビーズと反応後 (4°C, 1時間)、溶解液で5回洗浄し Laemmli サンプルバッファーで溶出した。各試料はSDS-PAGE (10% PAG) で泳動し、PVDF メンブレン (Immobilon, Millipore) に

転写後、各種抗体でイムノブロットした。

免疫蛍光染色

HEK293T細胞をラット尾由来コラーゲンを塗布したカバーガラス上で培養した。遺伝子導入後24時間培養し、4%パラホルムアルデヒド/PBSを用いて固定した(室温, 15分)。浸透液(10% FBS/0.1% Triton X-100/PBS)処理後(室温, 15分), 10% FBS/PBSを用いてブロッキングを行った(室温, 30分)。一次抗体, 抗Flagマウス単クローン抗体(M2, 1:500)及び抗HAラット単クローン抗体(3F10, 1:200)を10% FBS/PBSで希釈し細胞と反応させた(室温, 30分)。PBSで2回洗浄後, 二次抗体Alexa Fluor 546標識抗マウスIgG抗体(1:500), Alexa Fluor 488標識抗ラットIgG抗体(1:200)及びDAPI(1mg/ml, 1:1000)を10% FBS/PBSで希釈し細胞と反応させた(室温, 30分)。PBSで2回洗浄後, Pristine Mount (Research Genetics)で封入し, 共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss, LSM510)で観察した。

[結果]

酵母を用いたChk2キナーゼ会合分子のスクリーニングおよびChk2キナーゼとWip1ホスファターゼの会合動態の解析

Chk2キナーゼ新規共役分子を同定するために酵母2

ハイブリッド法を用いてスクリーニングを行った。キナーゼドメインを欠くChk2遺伝子をおとり遺伝子として使用し, 約25万コロニーのスクリーニングの結果, Wip1ホスファターゼを同定した。

次に, 会合分子として同定したWip1とChk2の結合部位の決定を行うため, Chk2の各種欠失型変異体を作製し, 酵母内におけるWip1とChk2の会合について解析を行った(図2)。その結果, Wip1はChk2(SQ/TQ)及びChk2(Δ Kinase)と結合し, SQ/TQドメイン欠失型変異体(Chk2(FHA)及びChk2(Δ SQ/TQ))とは結合しないことから, Wip1がChk2キナーゼのSQ/TQドメインを介して結合することが示唆された。しかし, Chk2キナーゼドメインが存在するとChk2-Wip1の結合がみられないことから酵母内ではChk2のキナーゼドメインがWip1との結合に関して抑制的に働くと考えられた。

Chk2キナーゼとWip1ホスファターゼの*in vitro*結合解析

大腸菌に発現させ精製した野生型及び各種変異型Chk2と野生型Wip1を強制発現させたHEK293T細胞の抽出液を反応させ, *in vitro*共沈実験を行った。Chk2(WT), Chk2(Δ FHA)及びChk2(Δ Kinase)はWip1と結合するものの, Chk2(Δ SQ/TQ)は結合が認められなかった(図3)。これらの結果より, *in vitro*におけるChk2キナーゼとWip1ホスファターゼ

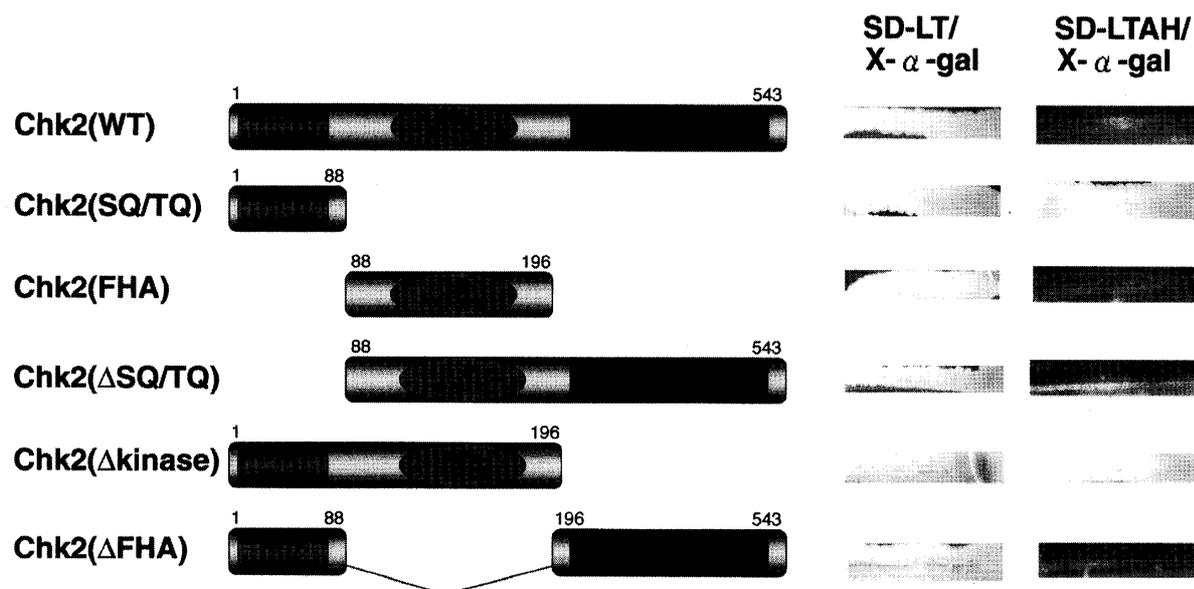


図2 酵母内でのChk2キナーゼとWip1ホスファターゼの会合解析。

pGBKT7-Chk2 (WT; SQ/TQ; FHA; Δ SQ/TQ; Δ FHA; Δ Kinase) 及びpGADT7-Wip1 (WT) を酢酸リチウム法で酵母AH109株に導入し, SD-LT培地 (SD/-Leu/-Trp) で培養後, 選択培地であるSD-LTAH培地 (SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/X- α -gal) にて培養した。選択培地においてChk2 (SQ/TQ) またはChk2 (Δ Kinase) をWip1と共に導入した酵母のみ増殖し, 青い発色が認められた。

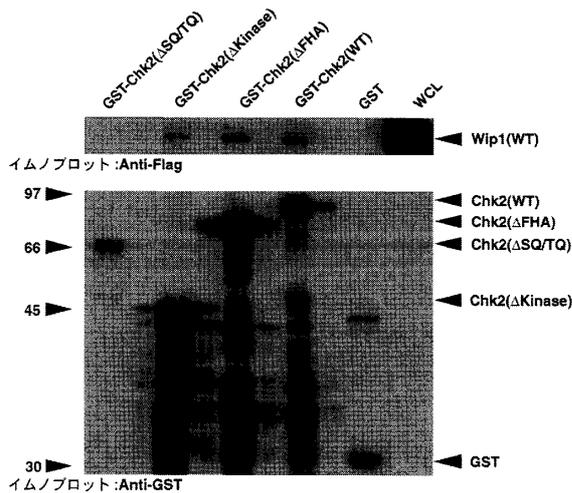


図 3 *in vitro* 共沈実験。GST-Chk2 (WT; Δ SQ/TQ; Δ FHA; Δ Kinase) 及び GST 蛋白質を大腸菌に発現させ、グルタチオンビーズにより精製し、Wip1-Flag を発現させた細胞の抽出液と反応した。ビーズの共沈試料と細胞抽出液 (WCL) を 10% SDS-PAGE を用いて泳動し、イムノブロットを行った。Wip1, GST 融合蛋白質はそれぞれ抗 Flag 抗体, 抗 GST 抗体を用いて検出した。

の結合には Chk2 キナーゼの SQ/TQ ドメインが必要であることが示唆された。

Chk2 キナーゼと Wip1 ホスファターゼの *in vivo* 結合解析

Flag 標識した野生型 Wip1 と GST-HA 標識した野生型及び変異型 Chk2 を HEK293T 細胞に遺伝子導入し、細胞を可溶化後、細胞抽出液をグルタチオンビーズと反応させ沈降実験を行った。*in vitro* の結合解析同様、Wip1 は Chk2 (WT) 及び Chk2 (Δ FHA) との共沈が認められた (図 4)。しかしながら、*in vitro* 結合解析と異なり、HEK293T 細胞を用いた発現系では Wip1 は Chk2 (Δ Kinase) と共沈しなかった。以上の結果より *in vivo* における Chk2 キナーゼと Wip1 ホスファターゼの結合には、Chk2 キナーゼ SQ/TQ ドメイン及びキナーゼドメインが必要であることが示唆された。

培養細胞に Chk2 (WT) または Chk2 (Δ FHA) を強制発現させると Chk2 のスレオニン 68 がリン酸化する。野生型の Wip1 はこれら 2 種類の Chk2 分子と会合するのみならず、Wip1 の共発現により両分子のスレオニン 68 リン酸化を抑制することを見出した (図 4)。以上の結果より Wip1 ホスファターゼが Chk2 のリン酸化スレオニン 68 を脱リン酸化する可能性が示唆された。また、Chk2 (Δ Kinase) には SQ/TQ ドメインが

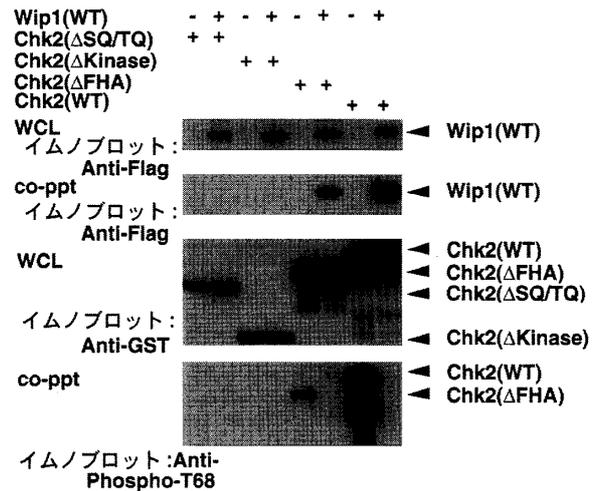


図 4 Chk2 キナーゼと Wip1 ホスファターゼの *in vivo* 結合解析。HEK293T 細胞に GST-HA-Chk2 (WT; Δ SQ/TQ; Δ FHA; Δ Kinase) 及び pcDNA-Flag-Wip1 (WT) 遺伝子をリン酸カルシウム法で導入した。細胞抽出液より GST 融合蛋白質をグルタチオンビーズにより精製し、ビーズの共沈試料 (co-ppt) と細胞抽出液 (WCL) を 10% SDS-PAGE を用いて泳動し、イムノブロットを行った。Wip1, 各 GST-Chk2 蛋白質それぞれ抗 Flag 抗体, 抗 GST 抗体を用いて検出した。また、各 GST-Chk2 蛋白質のスレオニン 68 のリン酸化を抗リン酸化 Chk2 (Thr68) 抗体を用いて検出した。

存在するにも関わらず強制発現によるスレオニン 68 のリン酸化は認められなかった。

Chk2 キナーゼと Wip1 ホスファターゼの細胞内局在

野生型 Flag-Wip1 及び野生型または変異型 GST-HA-Chk2 を HEK293T 細胞に遺伝子導入し免疫蛍光染色を行った。その結果、Chk2 (WT; Δ FHA; Δ SQ/TQ) 及び Wip1 (WT) は主に核内に、また Chk2 (Δ Kinase) は主に細胞質に局在した。キナーゼ活性欠失変異体 Chk2 (K249R) は核局在を示すことから (データ示さず), Chk2 の核局在には Chk2 のキナーゼ活性でなくキナーゼドメインが必要であることが明らかとなり、Chk2 キナーゼドメイン内に核移行シグナルが存在する可能性が示唆された。Chk2 (K249R) はスレオニン 68 のリン酸化が認められることから (データ示さず), 図 4 の結果と合わせて Chk2 スレオニン 68 のリン酸化には Chk2 の核局在が必要であると考えられる。

Wip1 ホスファターゼの存在は今回解析したどの Chk2 に対してもその細胞内局在に影響を与えなかった (図 5)。

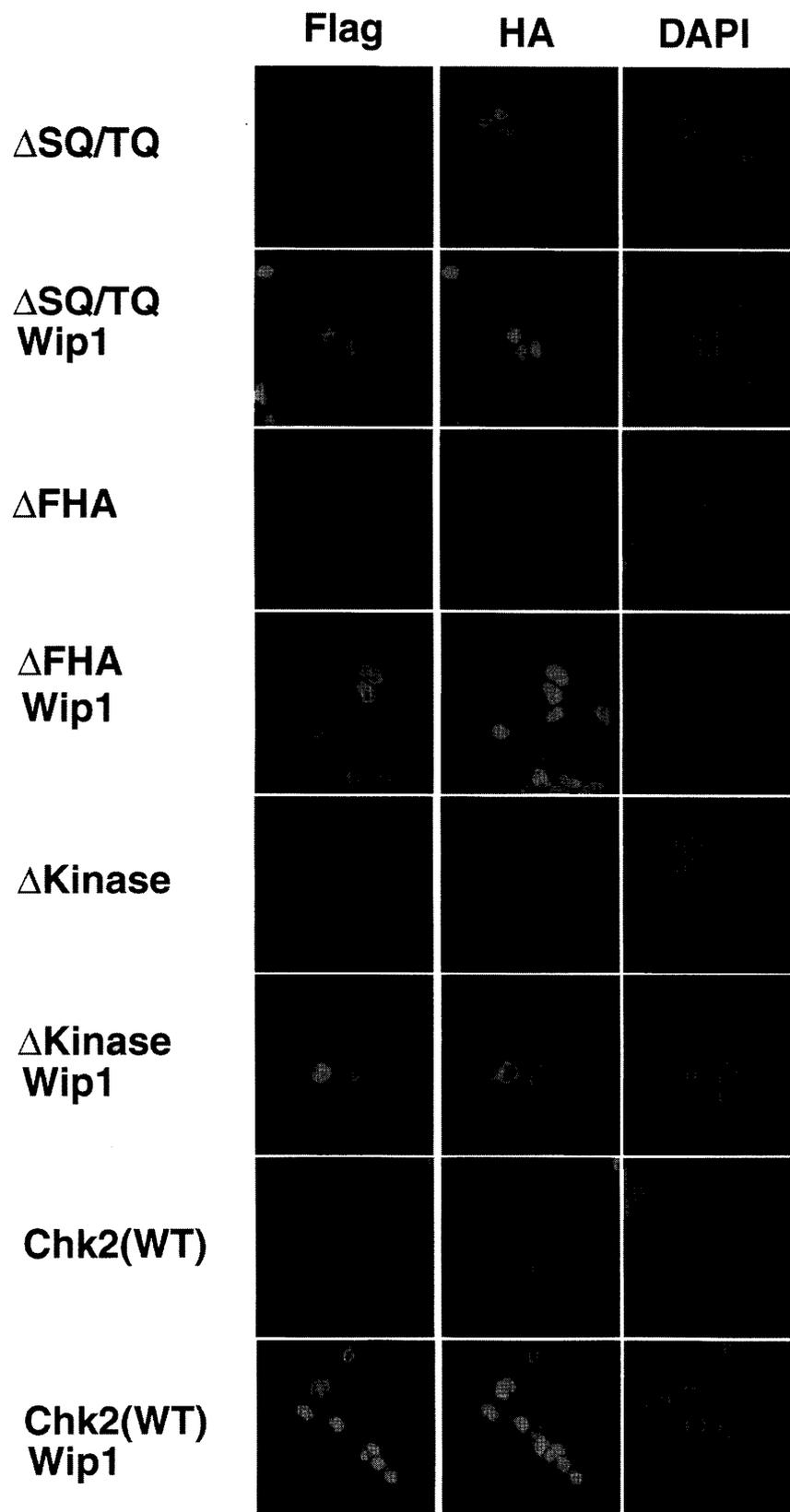


図 5 Chk2変異体とWip1の細胞内局在解析。HEK293T細胞にGST-HA-Chk2 (WT; Δ SQ/TQ; Δ FHA; Δ Kinase) とpcDNA-Flag-Wip1 (WT) をリポフェクション法で導入し、免疫抗体染色を行った。Chk2, Wip1をそれぞれ一次抗体抗Flagマウス単クローン抗体, 抗HAラット単クローン抗体, 二次抗体Alexa Fluor 546標識抗マウス IgG抗体, Alexa Fluor488標識抗ラット IgG抗体を用いて検出した。核はDAPIを用いて染色した。

[考 察]

本研究では、酵母を用いたスクリーニング実験によりChk2キナーゼの共役分子としてWip1 ホスファターゼを同定した。*in vitro* 及び *in vivo* における構造と機能の連関解析より、Chk2キナーゼのSQ/TQドメインがWip1ホスファターゼとの会合に必要であることが明らかとなった。培養細胞にChk2, Wip1を共発現させると、Chk2キナーゼの活性化に必須なスレオニン68のリン酸化が抑制されることからWip1ホスファターゼによるChk2キナーゼの活性制御機構が示唆された。

Chk2キナーゼは、543アミノ酸残基からなる分子量約60KDaの核内蛋白質であり、構造上の特徴としてセリン・スレオニンキナーゼドメインに加え、FHAドメインならびにN末端側のSQ/TQドメインを有している。FHAドメインは当初転写因子などの核内に局在する蛋白質において見出された100~150アミノ酸残基からなるドメインであり、蛋白質-蛋白質間の相互作用、特にリン酸化蛋白質とのリン酸化依存的な相互作用に関与することが知られている^{23), 24)}。Wip1ホスファターゼはFHAドメインを欠いたChk2キナーゼと会合できることから、Chk2-Wip1の結合にFHAドメインは関与しないと考えられた。一方、SQ/TQドメインは、癌抑制遺伝子産物p53やBRCA1にも存在しており、ATMによりリン酸化を受ける部位であることが知られている²⁵⁾。Chk2キナーゼにおいては、SQ/TQドメイン内に存在するスレオニン68のリン酸化に引き続き、キナーゼドメイン内の活性化ループ内のスレオニンが自己リン酸化され、Chk2キナーゼが最大限に活性化することが知られており、Chk2のSQ/TQドメインは、Chk2キナーゼの活性制御部位として機能している。本研究よりChk2-Wip1の結合にSQ/TQドメインが必要であることを明らかにしているが、さらにWip1との結合及びスレオニン68リン酸化の抑制はChk2のSQ/TQドメインのみで十分であるという実験結果を得ている(データ示さず)。以上の結果から、Chk2 SQ/TQドメインがChk2キナーゼの活性化のみならずWip1を介した不活化にも重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

in vitro の共沈実験において、Chk2 (Δ Kinase) とWip1の結合が認められたが、*in vivo* のアッセイでは結合が認められなかった。*in vivo* においてChk2 (Δ Kinase) は細胞質に局在しており(図5)、核に局在するWip1とは局在部位が異なる結果、*in vivo* においては結合が認められなかったものと推測される。キナーゼ活性欠失変異体Chk2 (K249R) は核局在を

示すものの *in vivo* においては結合が認められない(データ示さず)。このことはChk2-Wip1の結合にChk2のキナーゼ活性が必要であることを示唆している。例えばChk2がWip1をリン酸化することによりWip1がChk2と結合可能になるといったようなChk2のキナーゼ活性依存的なChk2-Wip1の結合制御が存在する可能性がある。酵母内においては、Chk2のキナーゼドメインがWip1との結合に抑制的に機能している。これは *in vivo* の結果とは逆であるもののChk2キナーゼドメインがChk2-Wip1の結合に関与することを示唆している。

Wip1はp53依存的に発現が誘導される分子として同定された。p53はChk2によりリン酸化を受け安定化・活性化することが知られており、細胞のDNA損傷応答においてもp53によりWip1が誘導され、その結果Chk2がWip1により抑制を受けるというモデルが考えられる。この負のフィードバック制御機構が、DNA修復後の細胞周期停止の解除等、過剰なDNA損傷応答の抑制に関与する可能性がある。Chk2, Wip1がそれぞれ癌抑制遺伝子産物、癌遺伝子産物として機能していることは、このモデルと非常に良く一致している。Wip1ホスファターゼによるChk2キナーゼの制御機構のさらなる解析によって得られる知見はDNA損傷応答の理解のみならず、癌の発生、進展の分子レベルでの理解に大きく貢献できるものと思われる。

[謝辞]

本研究にあたり、Wip1遺伝子を提供頂きました東京大学医学系研究科武川睦寛博士に深く感謝致します。また、ご指導を賜りました神戸大学医学系研究科ゲノム制御学講座南康博教授、ならびに、神戸大学医学系研究科応用分子医学講座消化器外科学黒田嘉和教授に厚くお礼申し上げます。

[文献]

- 1) Matsuoka, S., Huang, M., Elledge, S.J.: Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282 : 1893-1897, 1998.
- 2) Bartek, J., Falck, J., Lukas, J.:CHK2 kinase-a busy messenger. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 877-886, 2001.
- 3) Bartek, J., Lukas, J.: Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3: 421-429, 2003.
- 4) Blasina, A., de Weyer, I. V., Laus, M.C.,

- Luyten, W.H., Parker, A.E., McGowan, C.H.: A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. *Curr. Biol.*9:1-10, 1999.
- 5) Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M., Halazonetis, T.D.: Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G (1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* 14:278-288, 2000.
 - 6) Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., Prives, C.: The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.*14:289-300, 2000.
 - 7) Lee, J.S., Collins, K.M., Brown, A.L., Lee, C.H., Chung, J.H.: hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 404:201-204, 2000.
 - 8) Yang, S., Kuo, C., Bisi, E., Kim, M.K.: PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat. Cell Biol.*4: 865-870, 2002.
 - 9) Stevens, C., Smith, L., La Thangue, N.B.: Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.*5:401-409, 2003.
 - 10) Bell, D.W., Varley, J.M., Szydlo, T.E., Kang, D.H., Wahrer, D.C., Shannon, K.E., Lubratovich, M., Verselis, S.J., Isselbacher, K.J., Fraumeni, J.F., Birch, J.M., Li, F.P., Garber, J.E., Haber, D.A.: Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 286:2528-2531, 1999.
 - 11) Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., Elledge, S.J.: Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10389-10394, 2000.
 - 12) Melchionna, R., Chen, X.B., Blasina, A., McGowan, C.H.: Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1. *Nat. Cell Biol.*2 : 762-765, 2000.
 - 13) Ahn, J.Y., Schwarz, J.K., Piwnica-Worms, H., Canman, C.E.: Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res.*60: 5934-5936, 2000.
 - 14) Lee, C.H., Chung, J.H.: The hCds1 (Chk2)-FHA domain is essential for a chain of phosphorylation events on hCds1 that is induced by ionizing radiation. *J. Biol. Chem.*276:30537-30541, 2001.
 - 15) Ahn, J.Y., Li, X., Davis, H.L., Canman, C.E.: Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase Via the forkhead-associated domain. *J. Biol. Chem.*277:19389-19395, 2002.
 - 16) Xu, X., Tsvetkov, L.M., Stern, D.F.: Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization. *Mol. Cell. Biol.*22: 4419-4432, 2002.
 - 17) Ahn, J., Prives, C.: Checkpoint kinase 2 (Chk2) monomers or dimers phosphorylate Cdc25C after DNA damage regardless of threonine 68 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277:48418-48426, 2002.
 - 18) Fiscella, M., Zhang, H., Fan, S., Sakaguchi, K., Shen, S., Mercer, W.E., Vande Woude, G.F., O'Connor, P.M., Appella, E.: Wipl, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6048-6053, 1997.
 - 19) Takekawa, M., Adachi, M., Nakahata, A., Nakayama, I., Itoh, F., Tsukuda, H., Taya, Y., Imai, K.: p53-inducible wipl phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *Embo J.*19:6517-6526, 2000.
 - 20) Li, J., Yang, Y., Peng, Y., Austin, R.J., van Eyndhoven, W.G., Nguyen, K.C., Gabriele, T., McCurrach, M.E., Marks, J.R., Hoey, T., Lowe, S.W., Powers, S.: Oncogenic properties of PPM1D located within a breast cancer amplification epicenter at 17q23. *Nat. Genet.*31: 133-134, 2002.
 - 21) 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., Kallioniemi, A., Fornace, A.J., Jr., Appella, E.: Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat. Genet.*31:210-215, 2002.
 - 22) Saito-Ohara, F., Imoto, I., Inoue, J., Hosoi, H., Nakagawara, A., Sugimoto, T., Inazawa, J.: PPM1D is a potential target for 17q gain in

- neuroblastoma, *Cancer Res.* 63: 1876-1883, 2003.
- 23) Li, J., Williams, B.L., Haire, L.F., Goldberg, M., Wilker, E., Durocher, D., Yaffe, M.B., Jackson, S.P., Smerdon, S.J.:Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2.*Mol. Cell* 9:1045-1054, 2002.
- 24) Durocher, D., Jackson, S.P.:The FHA domain *FEBS Lett.*513:58-66, 2002.
- 25) Kim, S.T., Lim,D.S., Canman, C.E., Kastan, M.B.:Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members, *J.Biol. Chem.*274:37538-37543, 1999.

Structural and functional analysis of regulation of Chk2 kinase by Wip1 phosphatase

Xiaozhou Xu

Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine
Kobe University 7-5-1, Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan

Summary

The Chk2 tumour suppressor protein is an evolutionarily conserved nuclear protein kinase that plays a crucial role in the response to DNA damage. Following DNA damage, Chk2 kinase is activated by phosphorylation of threonine 68 by the protein kinase ATM (ataxia-telangiectasia-mutated). Activated Chk2 then phosphorylates its downstream effectors, including the tumour suppressors p53, BRCA1 and PML, as well as the Cdc25 phosphatases. In this study, I showed that Chk2 associates with the oncogenic protein Wip1 (PPM1D), and dephosphorylates threonine 68 on phosphorylated Chk2. To investigate mechanisms of Chk2 inactivation by Wip1, I generated a series of truncated protein of Chk2. Chk2 SQ/TQ domain, including threonine 68, is necessary for Wip1 binding with Chk2 *in vitro* and *in vivo*. Thus, it is indicated that Wip1 phosphatase inhibits Chk2 activity by binding SQ/TQ domain of Chk2.