

# 腫瘍抑制蛋白 p53変異体の分子動力学シミュレーション による立体構造解析

## 学位論文内容の要旨

p53遺伝子はヒトの腫瘍の半数以上に変異を認める癌抑制遺伝子である。p53蛋白は転写因子で、DNA損傷などのストレスによりp53蛋白はリン酸化を受けて活性化される。このp53蛋白はその標的となる遺伝子のプロモータにある特異的塩基配列に結合して転写制御を行う。この作用によってp53蛋白は細胞周期を停止させ、損傷DNAを修復する機構を活性化したり、過度のDNA損傷を持つ細胞にアポトーシスを誘導する。その変異の多くはp53蛋白の全アミノ酸393個のうち中間にあるアミノ酸102-292のいわゆる「コアドメイン」に局在する1塩基置換型の点変異である。p53蛋白は4量体を形成してDNAに結合するため、2つあるp53の対立遺伝子の一方が変異していると野生型p53蛋白と変異型p53蛋白が混合した4量体が形成される。その場合、4量体が変異型p53の存在のため全くDNA結合能(転写活性)を失ってしまう場合と、部分的にもDNA結合能を維持できる場合があり、前者をメンデル遺伝学のアナロジーにより優性阻害効果(dominant negative effectあるいはtransdominance)といい、後者を劣性(recessive)変異と呼ぶ。劣性変異の場合には上記のように4量体を形成しても野生型p53蛋白があればDNA結合能を保つ場合と、4量体を形成できない立体構造の変化のため野生型p53蛋白のみが4量体を形成してDNA結合能が保たれる2つの場合があると考えられる。フレームシフト変異やナンセンス変異によるアミノ酸翻訳の中断は、p53蛋白のC末端にある4量体形成ドメインを失わせて劣性変異となる。優性阻害性変異のp53蛋白のあるものは、その分解時間が著しく延長することが知られている。このため変異型p53蛋白が核内に蓄積して正常型p53蛋白に対して量的に過剰になることも優性阻害効果に寄与していると考えられる。一方、上述のアミノ酸中断型変異では、mRNAの安定性が失われ(non-sense mediated decay)、蛋白も正常p53蛋白に比べ分解されやすく、この量的効果が劣性変異となる原因の一つであるとも考えられている。

p53変異体がある場合、それが優性阻害性変異か劣性変異かを検討するためには細胞内にその変異体が野生型p53遺伝子と同じ発現量になるように遺伝子導入し、その細胞内でのp53蛋白転写活性を測定することが理想である。しかし、これは実際問題として多数の変異体のテストとしては困難である。我々は、p53蛋白が特異的DNA配列に結合してその下流の遺伝子の転写を活性化する能力を酵母内で直接評価できるp53 yeast functional assayを用いてp53蛋白機能異常を解析している。さらにその応用として野生型p53蛋白と変異型

p53 蛋白を同量酵母内に発現させ、それによる転写活性化能を酵母の色彩変化でとらえて、優性阻害性もしくは劣性変異を判定する transdominance assay を作成した。

transdominance assay ではヒト細胞のような変異型 p53 蛋白の分解遅延による蛋白量の上昇や mRNA 分解による蛋白量低下が酵母内では生じないため優性阻害性変異もしくは劣性変異の効果が単純化して見られる。上述のうち、優性阻害性変異もしくは劣性変異を決める因子は、第一に 4 量体形成をできるか否かであり、できない場合には劣性変異となる。4 量体形成ができる場合には、さらに野生型 p53 蛋白と変異型 p53 蛋白の heterotetramer が DNA 結合能を有し、十分な転写活性化能を発揮できるか否かにより、1) できる場合には劣性変異となり、2) できない場合には優性阻害性変異となることが予測される。大きな欠失や挿入、ナンセンス変異により 4 量体形成能が失われた場合には劣性変異となることはもちろんである。ミスセンス変異による 1 アミノ酸置換の場合、優性阻害性変異は、1) p53 コアドメインの DNA 結合面の安定化に重要な役割をもつアミノ酸に変異がある場合や 2) DNA 結合に直接関与するかあるいはそれらと相互作用をもつアミノ酸に変異がある場合に出現することが多い。これに対して劣性変異は、4 量体形成ドメインに影響を及ぼす部位や、DNA 結合に影響が少ない p53 コアドメインのパレル構造の主体である  $\beta$ -sheet に変異がある場合に出現するのが多いことが Marutani らの研究で判明している。今回我々はヒトの癌及び癌細胞株から既に報告されているものを含め我々自身が経験した変異型 p53 蛋白の transdominance assay について検討したところ、DNA 結合に直接関与するアミノ酸ではないがその比較的近傍の同じ部位で置換残基の違いより優性阻害性変異と劣性変異を示すものが存在することを見出した。これらの変異は、 $\beta$ -sheet 構造ではなく DNA 結合面を構成する部位にあり、その局所的立体構造の変化に差が生じた結果、それが DNA 結合能に反映されて優性阻害性と劣性の差が生じるのではないかと推測される。そこでこれらの変異体を用いて、アミノ酸の置換で p53 蛋白の立体構造がどのように変化するかを調べるために分子動力学シミュレーションを行った。アミノ酸置換や付加による蛋白立体構造変化の推定に用いられる多原子分子に対する分子動力学シミュレーションは、より小さい分子に対する古典的分子動力学法の応用である。X 線結晶解析や NMR 法により決定された原子座標を初期座標とし、アミノ酸変化の結果生じる初期安定構造を変化させる力場の発生により各原子が運動を起こして、最終的に収束してゆく過程をコンピュータシミュレーションする方法である。分子動力学計算は分子を構成している個々の原子の運動状態の時間発展を差分時間の力場に対するニュートン運動方程式の数値解を求めてシミュレーションすることによりなされる。近年、蛋白の変異体の立体構造解析に分子動力学シミュレーションを応用した論文がいくつか見られるようになってきている。この分子動力学シミュレーションを行った結果について、p53 変異が同じ置換部位でありながら、優性阻害性変異(以下 <DN> と略)あるいは劣性変異(以下 <RE> と略)のどちらかの特性を示すこの機序につき考察を加えて報告する。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也  
副 査 教 授 秋 田 弘 俊  
副 査 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

## 腫瘍抑制蛋白 p53変異体の分子動力学シミュレーション による立体構造解析

p53 蛋白は 4 量体を形成して DNA に結合するため、2 つある *p53* の対立遺伝子の一方が変異していると野生型 p53 蛋白と変異型 p53 蛋白が混合した 4 量体が形成される。その場合、4 量体が変異型 p53 の存在のため全く DNA 結合能(転写活性)を失ってしまう場合と、部分的にも DNA 結合能を維持できる場合があり、前者を優性阻害性(dominant negative あるいは transdominance)変異といい、後者を劣性(recessive)変異と呼ぶ。劣性変異の場合には 4 量体を形成しても野生型 p53 蛋白があれば DNA 結合能を保つ場合と、4 量体を形成できない立体構造の変化のため野生型 p53 蛋白のみが 4 量体を形成して DNA 結合能が保たれる 2 つの場合があると考えられる。

ミスセンス変異による 1 アミノ酸置換の場合、優性阻害性変異は、1) p53 コアドメインの DNA 結合面の安定化に重要な役割をもつアミノ酸に変異がある場合や 2) DNA 結合に直接関与するかあるいはそれらと相互作用をもつアミノ酸に変異がある場合に出現することが多い。これに対して劣性変異は、4 量体形成ドメインに影響を及ぼす部位や、DNA 結合に影響が少ない p53 コアドメインのパレル構造の主体である  $\beta$ -sheet に変異がある場合に出現するのが多い。今回我々はヒトの癌及び癌細胞株から既に報告されているものを含め我々自身が経験した変異型 p53 蛋白の transdominance assay について検討したところ、DNA 結合に直接関与するアミノ酸ではないがその比較的近傍の同じ部位で置換残基の違いより優性阻害性変異と劣性変異を示すものが存在することを見出した。これらの変異は、 $\beta$ -sheet 構造ではなく DNA 結合面を構成する部位にあり、その局所的立体構造の変化に差が生じた結果、それが DNA 結合能に反映されて優性阻害性と劣性の差が生じるのではないかと推測される。そこでこれらの変異体を用いて、アミノ酸の置換で p53 蛋白の立体構造がどのように変化するかを調べるために分子動力学シミュレーションを行った。その結果、劣性変異体に比べ優性阻害性変異体において、DNA 結合に関与するアミノ酸残基末端原子と近接する DNA 原子の距離増大が顕著なものが存在していることが判明し、この距離増大が DNA 結合に影響を与えていると考えられた。

公開發表において、副査 田中一馬教授より 1) 優性阻害性が出現する腫瘍について、2) p53 core domain の DNA の結合能と p53 - DNA 原子間距離の関連性について、3) p53 4 量体を初期座標として計算する必要性について、4) 初期座標の結晶化温度(-175 °C) と生体内での構造の差異についての質問があった。副査 秋田弘俊教授より 1) 腫瘍による優性阻害性及び劣性変異の頻度について、2) 今回見出された変異体の分子動力学シミュレーション以外での立体構造、DNA 結合能の実験結果について質問があった。主査 守内哲也教授より 1) ” gain of function” について、2) 優性阻害性変異の予後について質問があった。いずれの質問にたいしても、申請者は学位論文の背景および本研究の経過と結果について詳細な説明を行い、概ね適切に回答した。

この論文は、分子の立体構造を分子動力学シミュレーションで解析した点が高く評価され、今後の変異体構造解析に役立つことが期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。