

学位論文題名

Identification of protein kinase A catalytic subunit β as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function

(Aキナーゼ触媒サブユニット β と p73タンパク質の結合および p73タンパク質の機能制御に関する研究)

学位論文内容の要旨

【緒言】 p73 は癌抑制タンパク質 p53 のホモログであり、p53 結合配列をそのプロモーター上に持つ *p21^{waf1}* や *bax* 等の遺伝子群の発現を制御する転写因子として機能し、p53 と同様に G1/S 期での細胞周期停止やアポトーシスを引き起こす。最近の知見によると、シスプラチンなどの DNA 障害因子により、p73 はリン酸化やアセチル化などの化学修飾をされ転写活性が亢進すると報告されている。我々は、p73 α を bait とした yeast two-hybrid 法による結合タンパク質のスクリーニングの結果、cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit (PKA-C) β 4ab を同定した。PKA-C β は p73 α との相互作用およびリン酸化により、p73 α の転写活性を抑制し、その細胞増殖抑制能あるいはアポトーシス誘導能に対して負の制御をされると考えられた。【方法と結果】 ① p73 との新規結合タンパク質である PKA-C β の同定： p73 α を bait とした yeast two-hybrid 法で胎児脳由来の cDNA library をスクリーニングし、A キナーゼ触媒サブユニットである PKA-C β 4ab を同定した。② 細胞内での p73 と PKA-C β の結合： COS-7 細胞に p73 α と PKA-C β を強制発現させ、免疫沈降 (IP) 法および分画ウエスタンブロッティング (WB) 法、免疫蛍光法により p73 α と PKA-C β の結合および細胞核内での共存を確認した。一方、p53 と PKA-C β の結合は見られなかった。③ p73 α と PKA-C β の結合領域の同定： p73 α の各領域の GST 融合タンパク質と ³⁵S メチオニンで標識した PKA-C β を用いたプルダウン法により、PKA-C β は p73 α の転写活性化領域を含む N 端および転写抑制領域を含む C 端と結合することが確認された。④ PKA-C β による p73 の転写活性への影響： 機能的 p53 を欠損している H1299 細胞を用い、p53/p73 結合配列を持つ *p21^{waf1}* または *bax* のプロモーターを組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを使用し、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法にて PKA-C β による p73 および p53 の転写活性への影響を観察したところ、PKA-C β 発現プラスミドの形質移入量に合わせて、p73 α の転写活性は抑制された。一方、p73 α の C 端が部分的に欠損したスプライシングバリエーションの p73 β および p53 の転写活性への明らかな影響はみられなかった。また、p73 および p53 により誘導される内在性 *p21^{waf1}* の発現を WB 法で確認したところ、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法での結果と同様に、PKA-C β は p73 α による *p21^{waf1}* の発現を抑制

したが、p73 β と p53 による p21^{waf1} の発現には影響を及ぼさなかった。⑤PKA-C β による p73 のリン酸化：精製された A キナーゼ触媒サブユニットによる p73 α の各領域の GST 融合タンパク質を基質としたリン酸化実験により、p73 α の N 端の領域がリン酸化されることが確認された。また、PKA-C β の ATP 結合部位であるリシンをアルギニンに置換しリン酸化能を欠損させた PKA-C β (K76R)による p73 α の転写活性能への影響を実験④と同様の実験系で観察したが、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法および WB 法ともに p73 α の転写活性能への影響はみられなかった。⑥PKA-C β による p73 α のアポトーシス誘導能の抑制：H1299 細胞に p73 α 単独および p73 α と PKA-C β または PKA-C β (K76R)を強制発現させ、DNA 障害因子であるカンプトテシンによる p73 α のアポトーシス誘導能を MTT 法に準じて観察したところ、p73 α のアポトーシス誘導能は PKA-C β により有意差を持って抑制された。一方、PKA-C β (K76R)による影響はみられなかった。また、p53 を用いて同様の実験をしたが、p53 のアポトーシス誘導能は PKA-C β に影響されなかった。⑦内在性 A キナーゼによる p73 の転写活性能の阻害：A キナーゼ作用物質である dibutyryl cAMP および A キナーゼ阻害剤である H-89 の存在または非存在下に p73 α の転写活性能をルシフェラーゼレポーターアッセイ法および WB 法にて観察したところ、dibutyryl cAMP 存在下では p73 α のレポーター活性や内在性 p21^{waf1} の発現は阻害されたが、H-89 を加えることにより、レポーター活性や内在性 p21^{waf1} の発現は部分的に回復した。⑧PKA-C β による p73 分子内の相互作用の強化：H1299 細胞に p73 α 単独または p73 α および PKA-C β を強制発現させ、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法にて p73 α と p21^{waf1} および bax のプロモーター領域の結合を観察したが、両者に PKA-C β の存在による結合の差はみられなかった。一方、p73 α の転写活性化領域を含む N 端と転写抑制領域を含む C 端の結合を IP 法を用いて観察したところ、PKA-C β の存在によりこの結合は促進された。PKA-C β (K76R)による影響はみられなかった。【考察】今回の研究で、p73 α の新規結合タンパク質として PKA-C β を同定した。PKA-C β は p73 α の N 端および C 端と結合し、p73 α の転写活性能を抑制した。これは PKA-C β が p73 α の N 端にある転写活性化領域に C 端にある転写抑制領域を架橋することにより、p73 α が不活性型になるからであると考えられた。また、リン酸化実験を通じて、PKA-C β によるリン酸化が p73 α の転写活性抑制に必要であることが判明した。さらに、dibutyryl cAMP による cAMP/A キナーゼ情報伝達経路の活性化により p73 α の転写活性能は抑制され、A キナーゼ阻害剤である H-89 によりこの抑制効果は減弱した。以上のことから、A キナーゼによる p73 α の高次構造の変化およびリン酸化は、p73 α の転写活性能に対する新規の抑制機序であることが判明した。哺乳類の細胞において A キナーゼは情報伝達経路の差異により、細胞増殖促進的にも抑制的にも働く。A キナーゼによるアポトーシス抑制の機序として ERK や phosphatidylinositol 3-kinase/Akt 経路の活性化が知られている。また、A キナーゼは Bad や glycogen synthase kinase-3 β をリン酸化することによりそのアポトーシス能を阻害することも知られている。今回の研究は、A キナーゼによる p73 α の転写活性抑制が、A キナーゼによるアポトーシス抑制の機序のひとつであることを示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 藤 堂 省

学位論文題名

Identification of protein kinase A catalytic subunit β as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function

(Aキナーゼ触媒サブユニット β と p73タンパク質の結合および
p73タンパク質の機能制御に関する研究)

p73 は癌抑制タンパク p53 のホモログであり、G1/S 期での細胞周期停止やアポトーシスを引き起こす。最近の知見によると、シスプラチンなどの DNA 障害因子により、p73 はリン酸化やアセチル化などの化学修飾をされ転写活性が亢進すると報告されている。本研究では、p73 α を bait とした yeast two-hybrid 法による結合タンパク質のスクリーニングにより、cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit (PKA-C) β 4ab を同定し、生化学的手法を用いて p73 に対する PKA-C β の機能解析を施行した。

p73 α の各ドメインの GST 融合タンパクと ³⁵S メチオニンで標識した PKA-C β を用いたプルダウン法により、PKA-C β は p73 α の N 端および C 端と結合することを確認し、細胞内での p73 と PKA-C β の結合を、免疫沈降法により確認した。p53 と PKA-C β の結合は見られなかった。PKA-C β による p73 の転写活性への影響をルシフェラーゼレポーターアッセイ法にて観察したところ、PKA-C β により p73 α の転写活性は抑制されたが、p73 β および p53 の転写活性への明らかな影響はみられなかった。p73 および p53 により誘導される内在性 p21^{waf1} の発現を WB 法で確認したところ、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法での結果と同様に、PKA-C β は p73 α による p21^{waf1} の発現を抑制したが、p73 β と p53 による p21^{waf1} の発現には影響を及ぼさなかった。A キナーゼによるリン酸化実験により、p73 α の N 端がリン酸化されることが確認された。また、リン酸化能を欠損させた PKA-KI による p73 α の転写活性への影響を観察したが、影響はみられなかった。DNA 障害因子であるカンプトテシンによる p73 α のアポトーシス誘導能を MTT 法にて観察したところ、p73 α のアポトーシス誘導能は PKA-C β により抑制されたが、PKA-KI による影響はみられなかった。p53 のアポトーシス誘導能は PKA-C β に影響されなかった。dibutyryl cAMP および A キナーゼ阻害剤である H-89 を用いて p73 α の転写活性を観察したところ、内因性の A キナーゼにより p73 α の転写活性は抑制されることが示唆された。クロマチン免疫沈降法にて p73 α と p21^{waf1} および *bax* のプロモーター領域の結合を観察したが、両者に PKA-C β の存在による結合の差はみられなかった。一方、免疫沈降法を用いて p73 α の転写活性化領域を含む N 端と転写抑制領域を含む C 端の結合を観察したところ、PKA-C β の存在によりこの結合は促進された。PKA-KI による影響はみられなかった。以上の結果から、p73 α は PKA-C β にリン酸化されることにより、転写活性およびアポトーシス誘導能が抑制されると考えられた。

公開発表後、副査の畠山教授より 1)PKA-C β が p73 α と細胞核内で結合することの確認、2)PKA-KI が dominant negative に働くか、3) PKA-C β が p73 α と PKA の調整サブユニットを介して結合する可能性、についての質問があった。それに対して、1)免疫染色にて核内での共存の確認した、2)実験結果から、dominant negative に働くことは否定的である、3) PKA-C β と p73 α は直接結合していると考えられる、などの回答があった。また、主査の浅香教授から PKA-C β による p73 α の転写活性抑制が、臨床での癌細胞制御に応用できるかとの質問があった。それに対して、p53 が変異している癌細胞が A キナーゼ依存的に増殖している場合は、A キナーゼ阻害により制御できる可能性がある、との回答があった。副査の藤堂教授からは 1) PKA-C β による p73 α の転写活性抑制が生体内で実際どのような働きをしていると予想されるか、2)p53 をはじめとした癌抑制タンパクの臨床応用への今後の可能性、についての質問があった。それに対して、1)文献等から考察すると、神経系の発生などに関与している可能性が高い、2)アデノウイルスベクターによる治療の可能性がある、などの回答があった。最後に、主査の浅香教授が、生化学的な手法を用いて今後の臨床の場への応用を望む、との旨の感想を述べられた。

この論文は、A キナーゼによる p73 α の転写活性抑制が、A キナーゼによるアポトーシス抑制の機序のひとつであることを示した論文であり、今後の臨床治療への応用が期待される。

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。