

# チロシンホスファターゼ PRL-3による p53の転写活性制御

## 学位論文内容の要旨

癌抑制遺伝子産物である p53 は転写因子として機能し、標的遺伝子のプロモーター領域に存在する p53 結合配列に結合することで、150 種類以上の遺伝子の発現を制御していることが報告されている。通常 p53 は、MDM2 依存的にユビキチン化を受け、プロテアソーム系により分解されることで発現レベルは低く維持されている。しかし p53 は DNA 損傷をはじめとする様々なストレスに応答して安定化・活性化されて核内に蓄積し標的遺伝子の発現を介して細胞周期の停止、DNA 修復、アポトーシス、ならびに細胞老化を引き起こし、細胞の癌化を抑制していると考えられている。一方、ほとんどの癌で p53 遺伝子は変異が認められており、癌患者の生命予後の悪化と相関していることが多数報告されている。p53 遺伝子の変異は、主に DNA 結合領域を含むコアダメインに認められており、多くの場合一塩基変異である。このことは発癌抑制の経路において転写因子としての p53 が如何に重要であるかが示唆される。p53 の転写調節を介した発癌抑制のメカニズムとその破綻としての発癌メカニズムの詳細を知るために、p53 を中心とした蛋白質間相互作用ネットワークの全容を明らかにすることが必須であるが未だ不明な点も数多い。本研究では、p53 依存的な転写機構の更なる解明を目的に、p53 結合タンパク質の探索を行い、新規因子として protein phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3) を同定した。

PRL-3 (遺伝子名 PTP4A3) は protein tyrosine phosphatases (PTP) スーパーファミリーに属する PRL family の 1 つである。PRL family 蛋白質は、二重特異性ホスファターゼ機能 (セリン・スレオニンおよびチロシンの脱リン酸化を触媒する) に関与する C(X)<sub>5</sub>R active site motif (PTP ドメイン) を蛋白中央部に持ち、C 末端には翻訳後修飾としてファルネシル化修飾 (プレニル基やゲラニルゲラニル基とチオエーテル結合する) を受ける CAAX box が存在する。一般的に PRL は細胞膜のリン脂質と相互作用するファルネシル化修飾を受けるため膜上に存在すると考えられているが、PTP ドメインと CAAX box の間には塩基性アミノ酸が二つの領域に分かれている bipartite 型核局在化シグナル (NLS) が存在しており、核内に局在するという報告もある。

PRL-3 は、大腸癌、乳癌、肺癌ならびに胃癌において発現の上昇が報告されている。特に、転移性大腸癌においては非転移性大腸癌と比較してその発現が著しく上昇していることやその発現の上昇により癌細胞の運動性や浸潤能が亢進することが知られており、癌の悪性化因子であることが示唆されてきた。しかし一方で、マウスの系ではマイクロアレイ法により p53 の標的遺伝子として PRL-3 が同定され、p53 依存的に誘導されたマウス PRL-3

は細胞周期の停止を誘導することが示されていることから、現在癌化あるいは癌の悪性化における PRL-3 の役割は明確ではない。

本研究では、p53 の新規結合蛋白としての PRL-3 に注目し、p53 との関係を明らかにすることを目的とした。

はじめに、内在性 p53 が欠損しているヒト肺癌細胞株 H1299 を用いて、p53 および PRL-3 を過剰発現させた後、免疫沈降実験を行った。PRL-3 は野生型 p53 および p53 R248Q 変異体と細胞内で結合することを確認したが、同一 family に属する PRL-1 および PRL-2 の結合は確認できなかった。また PRL-3 は野生型 p53 のみならず p53 R248Q 変異体にも結合することを確認した。次に、PRL-3 と p53 の細胞内局在を調べる目的で、H1299 細胞に PRL-3 および p53 を遺伝子導入した後、蛍光抗体法による免疫染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。PRL-3 は細胞膜周辺と核において染色が認められた。また p53 は主に核において染色され、核に局在する一部の PRL-3 と p53 は共局在することが分かった。

次に PRL-3 は p53 の転写活性を制御しているという仮説を立て、PRL-3 が p53 の転写活性に与える影響をルシフェラーゼアッセイにより解析した。H1299、ヒト肺癌細胞株 A549 ならびにヒト骨肉腫細胞株 U2OS 細胞において、p53 結合配列を 15 回タンデムにつないだレポーターベクターを用いた解析から、p53 単独発現と比較して PRL-3 と p53 の共発現によりレポーター活性は増強した。また H1299 および A549 細胞において、p21<sup>Waf1</sup> および MDM2 遺伝子のプロモーター配列を有するレポーターベクターを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。p53 単独発現と比較して PRL-3 と p53 の共発現によりそれぞれのレポーター活性は増強するという結果を得た。そして、H1299 細胞を用いて p53 標的遺伝子の発現の変化を RT-PCR 法により解析した。p53 単独発現と比較して p53 および PRL-3 の共発現により、p53 の標的遺伝子である p21<sup>Waf1</sup> の mRNA の発現量が顕著に増加した。しかしながら p53 標的遺伝子である p53RFP、p53R2 ならびに BAX の mRNA の発現量に大きな差はなかった。発現量の増加が見られた p21<sup>Waf1</sup> についてウェスタン・ブロット解析を行ったところ、p53 単独発現と比較して p53 および PRL-3 の共発現により、約 1.5 倍の発現の上昇が認められた。

PRL-3 による p53 の転写活性の増強作用には、PRL-3 のホスファターゼ活性が寄与しているのではないかと考え、PRL-3 のホスファターゼ欠損変異体 2 種 (D72A および C104A PRL-3) を作製し、H1299 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。p53 依存的転写活性の上昇には、野生型 PRL-3 と 2 種の変異型 PRL-3 に大きな差は認められなかった。つまり、p53 の転写活性の増強作用には、PRL-3 のホスファターゼ活性は必要ではないことが示唆された。

以上の結果から、PRL-3 は p53 と核内で結合し、ホスファターゼ活性非依存的に p53 の転写活性を亢進させることが示唆された。さらなる研究により PRL-3 が p53 の転写活性を増強するより詳細なメカニズムを明らかにしていきたい。これらを解析することは、p53 による遺伝子の発現調節機構が更に明らかになるだけでなく、発癌や癌の悪性化における PRL-3 の役割について理解が深まり、癌の診断・治療に応用できる知見が得られることが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 農夫男

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 守 内 哲 也 (医学研究科)

## 学 位 論 文 題 名

### チロシンホスファターゼ PRL-3による

### p53の転写活性制御

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。最初に申請者より提出論文の概要が説明され、その後、申請者に対し提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問が行われた。以下に、論文の要旨と審査の内容を述べる。

#### 【論文の要旨】

本研究の目的は、p53 結合タンパク質の新規結合因子として protein phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3) を同定し、p53 依存的な転写活性に対する PRL-3 の効果を解析することである。

癌抑制遺伝子産物である p53 は転写因子であり、標的遺伝子の発現を介して細胞周期の停止、DNA 修復、アポトーシス、ならびに細胞老化を誘導する。ヒト癌で p53 遺伝子は 50% 以上の変異が認められており、その変異は p53 の転写因子としての機能の喪失をもたらす。p53 により制御される遺伝子発現は癌抑制の経路において中心的な役割を担っており、その分子レベルでの理解は発癌メカニズムを理解する上で重要である。一方、PRL-3 (遺伝子名 *PTP4A3*) は、大腸癌、乳癌、肺癌ならびに胃癌において発現が上昇すること、また *in vitro* において PRL-3 の発現の上昇により癌細胞の運動性や浸潤能が亢進することが報告され、近年癌の悪性化因子であることが示唆されている。しかしながら癌化あるいは癌の悪性化における PRL-3 の役割は未だ不明な点が多い。

本研究では、PRL-3 は p53 と結合し、p53 の転写活性を増強するという仮説のもとに解析を行った。

はじめに、免疫沈降法を用いて、p53 および PRL-3 の結合性を調べた。その結果、PRL-3 は野生型 p53 および p53 R248Q 変異体と細胞内で結合することを確認した。PRL-3 と同一

family に属する PRL-1 および PRL-2 と、p53 との結合は確認できなかった。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察から、PRL-3 と p53 は核において共局在していることが判明した。

次に、PRL-3 が p53 の転写活性に影響を与えるのではという仮説のもと、p53 結合配列がタンデムに 15 回繰り返されているレポーターベクターを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、p53 単独発現と比較して PRL-3 と p53 の両者の過剰発現により p53 の転写活性が増強するという結果を得た。そして p21<sup>Waf1</sup> および MDM2 レポーターを用いた実験でも、同様に PRL-3 と p53 の共発現により p53 の転写活性の増強が観察された。また、p53 標的遺伝子の発現を RT-PCR 解析およびウェスタン・ブロット法を用いて調べたところ、PRL-3 と p53 の共発現により、p21<sup>Waf1</sup> の mRNA および蛋白の発現量が顕著に増加することが分かった。

さらに PRL-3 のホスファターゼ活性が p53 の転写活性の増強を引き起こしているのではという仮説のもと、PRL-3 のホスファターゼ活性欠損変異体を作製し、ルシフェラーゼアッセイを用いて調べた。その結果、PRL-3 と p53 の両者の過剰発現系において、野生型 PRL-3 と同様に変異型 PRL-3 も p53 依存的な転写活性を増強させた。

以上の結果より本研究では、p53 新規結合蛋白として PRL-3 を同定し、PRL-3 は p53 と核内で結合すること、ホスファターゼ活性非依存的に p53 の転写活性を亢進させることが示唆された。今後、PRL-3 が p53 の転写活性を増強するメカニズムをより詳細に解析することにより、p53 による遺伝子の発現調節機構が更に明らかになるだけでなく、発癌や癌の悪性化における PRL-3 の役割について理解が深まり、癌の診断・治療に応用できる知見が得られると考えられる。

#### 【審査の内容】

以上、論文について概要が説明された後、各審査員より、本研究の背景、方法、結果、考察および関連の研究について質問がなされた。主な質問事項は、①PRL family のドメイン構造・機能について、②PRL-3 と p53 の結合部位、またその結合する生物学的意義について、③p53 変異体との結合、局在ならびに生物学的意義について、④PRL-3 の局在について、⑤PRL-3 の変異体について、などであった。論文提出者はいずれの質問に対しても明確かつ的確に回答し、さらに今後の研究についても発展的な将来展望を示した。

試問の結果、本論文は p53 新規結合蛋白として PRL-3 を同定し、PRL-3 がホスファターゼ活性非依存的に p53 の転写活性を亢進することを示唆した点において、今後の歯科医学の発展に大きく貢献するものと評価した。さらに、学位申請者は、本研究を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な学識を有していることを審査員一同が認めた。

よって、学位申請者は博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。