

学位論文題名

Study on Stability of Tetrameric Structure of Tumor Suppressor Protein p53

(癌抑制タンパク質 p53の四量体構造の安定性に関する研究)

学位論文内容の要旨

癌抑制タンパク質p53は393アミノ酸残基からなる転写因子であり、細胞の恒常性を維持するのに非常に重要な“ゲノムの守護神”と呼ばれている。p53は外部からのさまざまな放射線や紫外線などの遺伝毒性ストレスに応答して、安定化、活性化、四量体化することによって細胞周期の停止やアポトーシスなどを誘導する下流標的タンパク質を転写する。このp53機能発現には四量体の形成が必須であり、p53-DNA相互作用研究において単量体p53に比べ四量体p53は非常に高い親和性を示すことが知られている。この四量体化はC末端領域に位置するおよそ40残基の四量体形成ドメインにおいて単独で行われる。p53の変異はヒト悪性腫瘍で最も多く認められる異常であり、この四量体形成ドメイン中では41個もの変異がヒト悪性腫瘍から発見されている。四量体形成の異常は悪性腫瘍においてp53の機能に非常に大きな影響を与えると考えられている。そのため四量体形成ドメインの構造と安定性の研究はp53の機能解明に極めて重要である。四量体形成ドメインは326位から356位に位置しており、 β -strand、ターン、 α -helixを形成し、逆平行の β -strandと α -helixからなる二量体がそれぞれの α -helixを介した4-helix bundleを形成することにより“二量体の二量体”として特徴的な四量体を形成している。

本研究において、四量体構造形成に起因するp53の機能発現、それに伴う機能制御のためp53の四量体構造の安定性およびその安定化機構の解明を目指し、(1)疎水性コアにおける空隙の充填による構造の安定化、(2)ポリオール化合物による四量体の安定化、(3)四量体安定性へのMet酸化の影響、(4)脊椎動物におけるp53の分子進化解析に関する研究を実施した。

(1) 疎水性コアにおける空隙の充填による構造の安定化

四量体構造の安定性はその内部に存在する疎水性コアによって大きく影響を受けている。この疎水性コアに存在する三個のPhe残基は生物種間で高度に保存されている。側鎖にフェニル基を有するPheはタンパク質間およびタンパク質内の相互作用において中心的役割を果たすことが知られているため、p53四量体構造におけるPhe残基の特性解明を目指した。非天然アミノ酸を用いた解析の結果、341位のPheはこの疎水性コアの内部に存在する空隙の正面に位置し、この部位への嵩高く、自由度の高いアミノ酸残基の導入はその四量体構造を飛躍的に安定化させることが判明した。また、圧力変性解析およびX線結晶解析の結果、この安定化機構はその空隙を置換したアミノ酸残基の側鎖が充填することによって働いていることが明らかとなった。

(2) ポリオール化合物による四量体の安定化

グリセロールや糖などの多価水酸基を持つポリオール化合物は、タンパク質構造を安定化させることが知られている。本研究では、ヒト悪性腫瘍由来の変異型p53四量体形成ドメインの構造安定化に対する、各種ポリオール化合物の効果について解析した。グリセロー

ル存在下において四量体安定化能をゲルろ過、CDにより解析した。その結果、四量体構造の安定化効果が見られ、特に室温においてほぼ単量体しか形成しない変異ペプチドにおいて、ポリオール化合物存在下では四量体を形成していることが判明した。また、6種のポリオール化合物について安定化を解析し、p53四量体の安定化機構として、タンパク質表面の溶媒分子の排除による疎水性環境の向上、およびタンパク質-ポリオール化合物間の水素結合を介した相互作用が複合的に作用していることを示唆した。

(3) 四量体安定性へのMet酸化の影響

p53タンパク質は、酸化ストレスによって機能不全を引き起こすことが知られている。四量体形成ドメイン中には酸化に敏感なアミノ酸残基であるMetが存在する。そこで、このMet残基の酸化が四量体形成能に与える影響を詳細に解析した。まず野生型p53四量体形成ドメインペプチドのMet340が天然状態で酸化剤によって完全に酸化されることを示した。さらに、四量体形成能および熱力学的解析の結果、この酸化型p53四量体ペプチドは野生型とほぼ同じ立体構造を形成するが、その安定性が野生型に比べ大きく減少していることを明らかにした。この不安定化の要因として、四量体構造中2個のMetの隣接に起因する、酸化により新たに付加された酸素原子間の立体障害、並びに双極子モーメントの反発が考えられた。この四量体構造の不安定化は如実にそのp53タンパク質の機能発現を不活性化し、p53が酸化ストレスによって機能不全する一因となりうることが考えられた。野生型のp53タンパク質が遺伝的な変異によらず、四量体構造が不安定化することによって不活性化し、発癌に至ることが示唆された。

(4) 脊椎動物におけるp53の分子進化解析

生物種間でのp53タンパク質の四量体構造の安定性を比較するため、p53タンパク質の相同性解析を実施した。四量体形成ドメインでは、ターン部位に位置するGlyが完全に保存されており、四量体安定性に重要な疎水性コアを形成する残基も高い保存性を示した。特徴的な配列を持つ魚類、両生類、鳥類、哺乳類のp53の四量体形成ドメインペプチドを合成し安定性を解析したところ、四量体構造は脊椎動物において進化に伴い（魚類-両生類-鳥類、哺乳類）安定性が向上していることが判明した。進化の過程において四量体形成ドメイン中の α -helixのC末端部位が伸長することによって四量体構造の安定性を獲得したことが示唆された。また、詳細な四量体安定性解析の結果、機能発現に必須な四量体形成に必要な濃度を算出した。この値は各生物の体温で一定の値に収束し、四量体構造の安定性が生体環境の変化に依存して安定化したことが示唆された。DNA結合ドメインは四量体形成ドメインと同様に単独で固有の構造を形成することが知られており、脊椎動物における相同性解析の結果、DNA結合ドメインは保存性が非常に高く、特にヒト悪性腫瘍において高頻度で変異が見られる残基は完全に保存されていた。ヒトDNA結合ドメインとDNAとの結合に必要な濃度と上述の生体温度での四量体形成に必要な濃度の比較により、DNA結合ドメインは進化において早い段階で成熟しており、四量体形成ドメインの安定性が生体環境にตอบสนองしていることが示唆された。

p53の四量体構造の安定性を解析することは機能発現およびその制御機構を考える上で非常に重要である。本研究において、遺伝的な変異によらず四量体構造が不安定化することによって、p53の不活化が起こりうることを示唆した。加えて、ポリオール化合物を用いたタンパク質外部からの安定化機構および空隙の充填による著しい四量体構造の安定化機構を示した。これらのタンパク質構造の内外からの安定化機構は非常に汎用的であり、p53のみならずその他のタンパク質にも十分に効果を発揮することが考えられる。また、そのp53タンパク質が進化の過程においてどのように安定性を獲得してきたかを解析することにより、新規な機能発現とその制御機構を報告した。今回の結果から導かれた多量体構造とその機能の相関、および構造の安定性に制御される機能発現の機構はp53のみならずその他の多量体タンパク質に拡張されると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 村 上 洋 太
副 査 教 授 石 森 浩一郎
副 査 准教授 今 川 敏 明

学 位 論 文 題 名

Study on Stability of Tetrameric Structure of Tumor Suppressor Protein p53

(癌抑制タンパク質 p53の四量体構造の安定性に関する研究)

癌抑制タンパク質p53は、放射線や紫外線などの種々の遺伝毒性ストレスに応答して、安定化、活性化され、下流標的タンパク質を転写することによって細胞周期停止やアポトーシスなどを誘導し、ゲノム情報の完全性を維持している。このp53の癌抑制機能発現には、四量体の形成が必須である。p53遺伝子の変異はヒト悪性腫瘍で最も多く認められる異常であり、ヒト悪性腫瘍の50%においてその変異が報告されている。四量体形成ドメインはC末端領域に位置しており、この四量体形成ドメイン31残基中23残基で41個もの変異が報告されている。

p53四量体構造およびその機能に対する四量体形成ドメイン安定性の影響を解明することは、p53機構の理解のために極めて重要である。申請者は、p53四量体構造形成に起因するp53機能の発現およびその制御機構の解明を目的とした。本論文において、p53四量体形成ドメインの構造および安定性解析により、疎水性コアにおける空隙の充填による構造の安定化、ポリオール化合物による溶媒効果を介した四量体安定化、四量体安定性への酸化ストレスの影響、脊椎動物におけるp53の分子進化解析に関する研究を報告した。まず申請者は、空隙の充填による著しい四量体構造の安定化機構およびポリオール化合物を用いたタンパク質外部からの安定化機構を明らかにした。また、遺伝的な変異によらず酸化等の遺伝毒性ストレスによっても直接的にp53四量体構造の不安定化を誘引し、p53の不活化が起こりうることを示唆した。さらに、各種脊椎動物におけるp53タンパク質の四量体構造の安定性解析により、進化の過程における構造安定性の獲得が環境と体温の選択圧を強く受けているという新規モデルを提唱した。

本論文で申請者が提唱した多量体構造とその機能の相関、および構造の安定性を介した機能発現の制御機構およびモデルは、p53のみならずその他の多量体タンパク質に拡張が可能であり、非常に優れた業績として高く評価される。以上のことより、審査員一同は、申請者が、北海道大学博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。