

学 位 論 文 題 名

Study on Tetramer Formation and Functional Regulation of Tumor Suppressor Protein p53

(癌抑制タンパク質 p53 の四量体形成と機能制御に関する研究)

学位論文内容の要旨

癌抑制タンパク質 p53 は遺伝毒性ストレスに応答して活性化し、細胞周期停止、アポトーシスに関わる下流の標的遺伝子の転写を制御している転写因子である。p53 は microRNA のプロセッシング制御やミトコンドリアにおけるアポトーシス誘導にも関与し、細胞の癌化を抑制している。また、induced pluripotent stem (iPS) 細胞の樹立過程を阻害するなど、p53 は様々な細胞内イベントに関与していることが知られている。このため、p53 タンパク質の制御機構を理解することは細胞の癌化防御のみならず、細胞周期制御に関する研究にとって不可欠である。p53 は C 末端領域に位置する四量体形成ドメイン (326-356 位) を介してホモ四量体を形成して機能する多量体タンパク質であり、この四量体形成は転写活性やアポトーシス誘導などの p53 の機能発現に必須である。四量体形成ドメインは、 β ストランド、ターン、 α ヘリックスから構成され、二量体の二量体として四量体を形成する。

本研究は、p53 の四量体形成および構造安定性の定量的な解析をもとに、四量体形成による細胞内 p53 機能制御機構の解明を目的とし、(1) 悪性腫瘍由来の四量体形成ドメイン変異型 p53 の四量体形成と安定性、(2) カリックスアレーン誘導体による変異型 p53 の四量体構造安定化による機能修復、(3) 四量体形成ドメインペプチドによるヘテロオリゴマー形成を介した p53 機能阻害に関する研究を実施した。

(1) 悪性腫瘍由来の四量体形成ドメイン変異型 p53 の四量体形成と安定性

p53 タンパク質をコードする TP53 遺伝子の変異はヒト悪性腫瘍中で最も多く見られる異常である。ヒト悪性腫瘍において報告されている、四量体形成ドメイン 31 残基中に存在する 49 個のミスセンス変異が四量体構造に及ぼす影響を定量的に解析するため、Circular Dichroism (CD) を用いた変異型 p53 四量体形成ドメインペプチドの網羅的な熱安定性解析を実施した。その結果、変異による四量体構造の不安定化の効果は連続的に分布していることが示された。疎水性コアの変異により四量体構造が著しく不安定化する一方、側鎖が溶媒に接している残基の変異が安定性に及ぼす不安定化効果は小さいことが示された。さらに、得られた熱力学データを用いて p53 の核内濃度における四量体の割合を算出した結果、大きく不安定化している疎水性コアの変異体だけでなく、不安定化効果の比較的小さな変異体においても、細胞の核内濃度では四量体が著しく低下していることを明らかとした。p53 の四量体形成は DNA 結合だけでなく、翻訳後修飾、タンパク質間相互作用にも影響を及ぼすことが知られている。加えて、翻訳後修飾により四量体形成、p53 タンパク質の安定化、転写活性化能が促進されることが報告されている。このため、四量体形成ドメインの変異は四量体構造の不安定化を介して翻訳後修飾等をも低下させ、さらなる四量体構造の不安定化を引き起こすと考えられる。すなわち、p53 の機能不全を引き起こす不安定化の閾値は非常に低

いことが示唆された。遺伝毒性ストレスに応答した安定化や翻訳後修飾の効果も同様に増幅され、迅速に活性化することで癌抑制機能を発揮することを可能にしていると考えられる。*in vitro* で見られる四量体形成の変化が細胞内 p53 の機能に及ぼす影響を解明するため、変異型四量体構造の安定化、あるいはホモ四量体形成の阻害を介した機能制御を実施した。

(2) カリックスアレーン誘導体による変異型 p53 四量体構造安定化による機能修復

乳癌、白血病、肉腫など、様々な癌を早期に発症する Li-Fraumeni 症候群は、TP53 遺伝子の変異により引き起こされる遺伝疾患である。四量体形成ドメイン中に存在する残基 Arg337 位の His への変異は Li-Fraumeni 症候群に見られる変異であり、この R337H 変異を持つ四量体形成ドメインペプチドは、天然型ペプチドに比べて四量体構造の安定性が著しく低下しており、R337H 変異をもつ p53 タンパク質は、DNA 結合能・転写活性が低下している。本研究では、Li-Fraumeni 症候群に見られる四量体形成ドメイン変異体 R337H を機能修復する安定化剤の開発を実施した。R337H ペプチドの四量体構造を安定化させるため、四量体構造表面のニカ所に存在する 6 個の Glu 残基をターゲットとした新規化合物、imidazole-calix[6]arene をデザインし、合成した。CD を用いた解析から、このカリックスアレーン誘導体は、R337H 変異を持つ四量体形成ドメインペプチドの四量体構造を顕著に安定化させることが判明した。さらに、細胞を用いたレポーターアッセイによる p53 転写活性の解析から、カリックスアレーン誘導体により R337H 変異をもつ p53 タンパク質の転写活性を増加させることに成功した。

(3) 四量体形成ドメインペプチドによるヘテロオリゴマー形成を介した機能阻害

iPS 細胞は体細胞に四つの転写因子 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* を導入することで作成でき、様々な細胞へ分化することができる分化万能性を有している。しかしながら、p53-p21 経路の活性化が iPS 細胞樹立過程を抑制するため、iPS 細胞作製効率は非常に低い。このため、p53 機能の一過性、効率的な阻害により、iPS 細胞作製の効率を上昇させると考えられる。本研究では、p53 が四量体として機能することに着目し、ヘテロオリゴマー形成により p53 機能を阻害する阻害ペプチドの開発を実施した。四量体形成ドメインペプチドを細胞内に導入するため、protein transduction domain (PTD) であるポリカチオン配列を融合した PTD 融合 p53 四量体形成ドメインペプチドを化学合成した。*in vitro* における結合アッセイから、PTD 融合 p53 ペプチドは天然型 p53 四量体形成ドメインペプチドとヘテロオリゴマーを形成することを確認した。さらに、蛍光ラベルした PTD 融合 p53 ペプチドを用いて細胞内導入を確認した結果、PTD 融合 p53 は細胞内へと移行し、核に局在することが明らかとなった。ペプチド存在下での p53 タンパク質の転写活性をレポーターアッセイにより解析し、PTD 融合 p53 ペプチドにより p53 タンパク質の転写活性を著しく低下させることに成功した。この阻害効果は単量体変異 L344P を導入したペプチドでは見られなかったことから、PTD 融合 p53 ペプチドは p53 タンパク質とのヘテロオリゴマー形成により機能を阻害していることが示唆された。

本研究において、細胞内の様々なイベントに関わる p53 の機能不全となる不安定化の閾値が極めて低いことを見い出した。さらに、四量体形成をわずかに変化させることで、細胞内 p53 の機能を制御可能であることが示された。p53 は遺伝毒性ストレスに応答し、迅速に活性化して機能を発揮することで腫瘍形成を抑制する。さらに、細胞周期停止、アポトーシス等を誘導した後、速やかに不活性化される。本研究により得られた結果より、p53 は四量体形成のわずかな変化により活性を制御することで、外部からの刺激に迅速に応答することを可能にしていると考えられる。

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 鈴 木 孝 紀

副 査 准教授 今 川 敏 明

学 位 論 文 題 名

Study on Tetramer Formation and Functional Regulation of Tumor Suppressor Protein p53

(癌抑制タンパク質 p53 の四量体形成と機能制御に関する研究)

細胞の癌化は癌遺伝子の活性化および癌抑制遺伝子の不活性化が深く関与している。癌抑制タンパク質 p53 の遺伝子は悪性腫瘍の中で最も多くの変異が報告されており、多くの悪性腫瘍において不活性化していることが知られている。p53 は遺伝毒性ストレスに応答して活性化し、細胞内の様々なシグナル経路を制御し、細胞周期停止、アポトーシスを誘導する。また、induced pluripotent stem (iPS) 細胞の樹立過程を阻害するなど、p53 は様々な細胞内イベントに関与していることが知られている。このため、p53 タンパク質の制御機構を理解することは細胞の癌化防御のみならず、細胞周期制御に関する研究にとって不可欠である。p53 は C 末端領域に位置する四量体形成ドメイン (326-356 位) を介してホモ四量体を形成して機能する多量体タンパク質であり、この四量体形成は転写活性やアポトーシス誘導などの p53 の機能発現に必須である。四量体形成ドメインは、 β ストランド、ターン、 α ヘリックスから構成され、二量体の二量体として四量体を形成する。申請者は、p53 の四量体形成および構造安定性の定量的・網羅的解析に基づき、悪性腫瘍由来の変異による機能不全化機構および四量体形成を介した細胞内 p53 の詳細な機能制御機構を解明している。さらに、申請者はそこで得た結果を基に、p53 の機能調節に関する二つのプロジェクトを実施した。

本論文は 5 章で構成されている。

第 1 章では、癌抑制タンパク質 p53 の構造、機能制御に関連した現在までに報告された研究について総括している。さらに、本研究の目的を示しその重要性を述べている。

第 2 章では、p53 四量体形成ドメイン変異による p53 の機能不全化機構の解明を行っている。ヒト悪性腫瘍において報告されている、四量体形成ドメイン 31 残基中に存在する 50 個のミスセンス変異が四量体構造に及ぼす影響を定量的に解析するため、Circular Dichroism を用いた変異型 p53 四量体形成ドメインペプチドの網羅的な熱安定性解析を

実施している。その結果、変異による四量体構造の不安定化の効果は連続的に分布していることを明らかにしている。さらに、得られた熱力学データを用いて p53 の核内濃度における四量体の割合を算出した結果、大きく不安定化している疎水性コアの変異体だけでなく、不安定化効果の比較的小さな変異体においても、細胞の核内濃度では四量体が著しく低下していることを示した。以上の結果より、申請者は p53 の機能不全を引き起こす不安定化の閾値が非常に低いという新規モデルを提案している。このモデルから、p53 は遺伝毒性ストレスに迅速応答するため、わずかなタンパク質濃度・安定性の変化により機能を制御し、癌抑制機能を発揮することを可能にしていることが示唆された。

第 3 章では、TP53 遺伝子の変異により引き起こされる遺伝疾患である Li-Fraumeni 症候群に見られる四量体形成ドメイン変異 R337H の四量体構造安定化を介した機能修復剤の開発を実施している。R337H ペプチドの四量体構造を安定化させるため、四量体構造両側の表面にそれぞれ存在する 6 個の Glu 残基を標的相互作用部位として新規化合物、imidazole-calix[6]arene をデザインし、合成した。このカリックスアレーン誘導体は、R337H 変異を持つ四量体形成ドメインペプチドの四量体構造を顕著に安定化させることを示した。さらに、細胞を用いた蛍光タンパク質 EGFP および mCherry を用いたレポーターアッセイによる p53 転写活性の解析から、カリックスアレーン誘導体により R337H 変異をもつ p53 タンパク質の転写活性を増加させることを示した。本化合物は、p53 四量体安定化を介した機能修復剤であり、今後の展開が期待される。

第 4 章では、iPS 細胞の効率的な作製法の確立を目指し、ヘテロ四量体形成によるドミナントネガティブ効果を介した p53 機能抑制剤の開発を行っている。iPS 細胞は体細胞に四つの遺伝子 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* を導入することで作成でき、様々な細胞へ分化することができる分化万能性を有している。しかしながら、p53-p21 経路の活性化による iPS 細胞樹立過程抑制のため、iPS 細胞作製効率が極めて低いことが問題となっている。このため、p53 機能の一過性、効率的な阻害により、iPS 細胞作製の効率を上昇させると考えられる。申請者は、p53 が四量体として機能することに着目し、四量体形成ペプチドと p53 タンパク質とのヘテロオリゴマー形成により p53 機能を阻害する阻害ペプチドの開発を実施した。四量体形成ドメインペプチドを細胞内に導入するため、Protein Transduction Domain (PTD) であるポリカチオン配列を融合した PTD 融合 p53 四量体形成ドメインペプチドを化学合成した。合成した PTD 融合 p53 ペプチドが *in vitro* において p53 配列とのヘテロオリゴマー形成能を有し、効率的に細胞内へと導入されることを明らかとした。さらに、PTD 融合 p53 ペプチドにより、ヘテロオリゴマー形成を介して細胞内の p53 転写活性を著しく低下させることに成功した。

第 5 章では、本研究で得られた結果の総括と、p53 四量体形的重要性と生理的意義、さらには機能調節における多量体形成平衡の濃度領域の重要性について、今後の展開について述べている。

本論文で申請者が提唱した新規モデルにより、p53 は四量体形成のわずかな変化により活性を制御することで、外部からの刺激に迅速に応答することを可能にしているという機能制御機構を明らかにしており、非常に優れた業績として高く評価される。関連原著論文は 3 編あり、英文で国際誌に掲載されている。よって審査員一同は、申請者が北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと判定した。