



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Stability and Regulation of Tetramer Formation in Tumor Suppressor Protein p53 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	和田, 隼弥
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第12331号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61891
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Junya_Wada_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 和 田 隼 弥

学 位 論 文 題 名

Study on Stability and Regulation of Tetramer Formation in Tumor Suppressor Protein p53

(癌抑制タンパク質 p53 の四量体構造の安定性と制御に関する研究)

癌抑制タンパク質 p53 は、紫外線、放射線、化学物質による DNA 損傷、低酸素および栄養欠乏も含む、種々の細胞ストレスに対して、細胞周期停止、アポトーシス、細胞分化、代謝経路、オートファジーなどの多様な細胞応答シグナル経路の中核となる重要なタンパク質である。p53 の主要な活性化の機構は、50 箇所を超える翻訳後修飾と、発現量増加による多量体形成であり、これにより 100 を超える下流標的遺伝子上の p53 応答配列への結合および他のタンパク質との相互作用が促進される。p53 の機能発現に必須である多量体構造は、C 末端側の四量体形成ドメインにより一義的に規定される。四量体形成ドメインは全長 393 アミノ酸残基からなる p53 の 326 位から 356 位に位置しており、2 個の単量体が逆平行 β -strand, turn, α -helix からなる二量体を形成する。さらに 2 個の二量体が 4-helix bundle を介して特徴的な四量体構造を形成している。細胞内では、濃度と翻訳後修飾に依存した単量体-四量体間の平衡状態が存在している。このように細胞応答全般と関連している多機能タンパク質である p53 は、細胞内における機能の多様性ゆえに、その制御機構が複雑であり、依然として全容が明らかとなっていない。

本研究では、癌抑制タンパク質 p53 の四量体形成について、その構造安定性制御機構および細胞内における意義について理解することを目的として、(1) 四量体形成ドメイン中のアルギニン残基メチル化の p53 四量体構造に対する効果、(2) p53 四量体構造の熱力学的安定性の大腸菌系における発現量に対する効果、に関する研究を実施した。これらの結果から、より精密な制御が必要となる p53 に対する新たな阻害手法として (3) ヘテロ四量体形成を介した p53 活性に対するペプチド阻害剤の開発、を実施した。

本学位論文は、全五章より構成されている。第一章では総括的な序論として研究の背景および目的を述べている。第二章では、四量体形成ドメイン中のアルギニン残基のメチル化による p53 四量体構造への不安定化効果について述べている。四量体形成ドメインは他のドメインと比較して、ほとんど翻訳後修飾を受けないが、3 個の近接したアルギニン残基側鎖(333, 335, 337 位)が、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 5 (PRMT5) によってモノおよびジメチル化される。これまでに、PRMT5 が p53 の標的遺伝子の活性化や p53 自身の発現量、細胞周期に影響を与えることが報告されてきたが、その制御機構については、不明であった。これらのメチル化翻訳後修飾に対して、修飾の順序、四量体構造の安定性に与える影響を明らかにし、メチル化による p53 機能制御機構の解明を目指した。in vitro methylation assay の MSMS スペクトルの解析から、アルギニン残基のメチル化は、335 位のモノメチル化から始まり 333 位を経て 337 位で終わる、一定の順序を有していることが示された。また Circular Dichroism (CD) スペクトルおよび Isothermal Titration Calorimetry (ITC) による構造安定性の解析から、それぞれの残基のメチル化は四量体構造に対して、大きく異なる不安定化への寄与を有することが明らかとなった。333, 335 位は、わずかな不安定化効果しか示さなかったが、337 位は CD の熱変性解析において、安定性の指標となる T_m を約 20℃ も低下させる顕著な不安定化効果を示した。

この不安定化は Arg337 と Asp352 間の水素結合が失われることに起因することが示唆される。これらの結果から、335 位のメチル化がきっかけとなり、最終的に構造の安定化に重要な 337 位がメチル化される修飾カスケードにより、p53 の四量体構造は大きく不安定化することが明らかとなった。この不安定化を利用した p53 活性の制御機構として、四量体構造の安定性を適度に負に制御することにより、p53 との結合能が異なる下流標的遺伝子が選択的に転写活性化されるモデルを構築した。これにより多様な p53 機能は、精密に制御された選択的な転写活性化に基づいていることが示唆された。

第三章では、タンパク質構造の熱力学的安定性と大腸菌における発現量の相関の定量的な解析について述べている。大腸菌発現系は、生化学的な研究においてタンパク質を調整する手法として広く用いられている。しかし、一般的に構造安定性の低いタンパク質は大腸菌系における発現精製が困難であると考えられてきた。そこで今回は、タンパク質の構造安定性が大腸菌における発現量に与える効果を定量的に解析した。解析のモデルとして、ドメイン構造自身や mRNA の安定性を変えずに、熱力学的安定性のみを幅広く変化させることが可能な癌抑制タンパク質 p53 の四量体形成ドメイン点変異体を利用した。幅広い熱力学的安定性を示す変異体の中で、四量体解離の自由エネルギーである ΔG_u が 100 kJ/mol 以下の安定性を示す変異体では、大腸菌における発現がほとんど見られなかった。一方で、それ以上の安定性を有する変異体については、発現量と熱力学的安定性が、正の相関を示した。さらに、発現のための下限値付近の熱力学的安定性を有する変異体の発現効率は、大腸菌の培養温度を低下させることで増加した。これらの結果から、大腸菌におけるタンパク質発現において、構造の熱力学的安定性は、発現量の確保のために、非常に重要な要因であることが示された。

第四章では、ヘテロ四量体形成を介した p53 活性に対するペプチド阻害剤の開発について述べている。人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立や特定の細胞への分化など、細胞のリプログラミングは再生医療や薬剤開発の発展のために大きく貢献している。これらの細胞のリプログラミングの効率よく行うためには、癌抑制タンパク質 p53 の不活性化が必要である。しかしながら、TP53 のノックアウトなどによる不可逆のおよび長期的な阻害は、その後の細胞の癌化抑制能を大きく低下させるために、一過的、特異的かつ、阻害能を容易に調整可能な手法の開発が望まれる。そこで、p53 の多量体形成を利用した、新規ペプチド阻害剤をデザインした。p53 の四量体形成ドメインを基盤とし、細胞への導入および細胞核への局在のシグナル配列を付加したペプチド阻害剤は、添加後速やかに細胞内に導入され、濃度依存的に p53 応答配列特異的な転写活性化能を阻害した。さらに *in vitro* で四量体形成ドメインとヘテロ四量体を形成することが示された。これらの結果から、本ペプチド阻害剤は、内源性 p53 タンパク質とヘテロな四量体を形成し、活性化したタンパク質同士のホモ四量体形成を阻害することで、活性を抑制することが示された。ペプチドとしての“分解性”や“ドメイン構造”を“一過性”や“阻害の特異性”として活かした本阻害剤は、今後、RNAi や特異性の低い低分子阻害剤の使用が困難な状況において有用であることが期待される。

第五章では、研究を総括した結論を述べている。従来の p53 に関する研究では、不活性化による細胞癌化、翻訳後修飾による活性化メカニズムの解明、および不活性化に対応するための活性化剤の開発が実施されてきた。しかしながら、本研究において四量体形成ドメインの翻訳後修飾であるメチル化は、その多量体構造の熱力学的安定性を顕著に不安定化させた。これは、p53 活性を顕著に負に制御する翻訳後修飾である。また、p53 の活性化は、細胞の分化・脱分化の過程を抑制しており、これらは p53 の不活性化により亢進される細胞応答である。以上より、p53 の機能は、正の方向だけでなく、負の方向にも適切な強度で制御される必要があることが示唆された。今回の結果から導かれた多量体構造の安定性の制御に関する知見は、p53 のみならず、その他の多量体タンパク質にも拡張されると考えられる。