



# 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             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/61891">https://hdl.handle.net/2115/61891</a>                                                                          |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a>                                  |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                            |
| File Information    | Junya_Wada_review.pdf, 審査の要旨                                                                                                                               |



## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (理学) 氏名 和田 隼 弥

|       |    |     |       |                |
|-------|----|-----|-------|----------------|
| 審査担当者 | 主査 | 教授  | 村上 洋太 | 「理学研究院 化学部門」   |
|       | 副査 | 教授  | 坂口 和靖 | 「理学研究院 化学部門」   |
|       | 副査 | 教授  | 佐田 和己 | 「理学研究院 化学部門」   |
|       | 副査 | 教授  | 高木 睦  | 「工学研究院 応用化学部門」 |
|       | 副査 | 准教授 | 今川 敏明 | 「理学研究院 化学部門」   |

## 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  $\beta$ -strand, turn,  $\alpha$ -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、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。これらのメチル化に対して、修飾の順序、構造安定性への影響を明らかにし、p53 機能制御機構解明を目指した。in vitro methylation assay から、メチル化は 335 位から始まり 333 位を経て 337 位へ向かう一定のカスケードを有することが示された。また構造安定性の解析から、333, 335 位は、わずかな不安定化効果を示したが、337 位は熱変性解析において、安定性の指標となる  $T_m$  を約 20°C も低下させる顕著な不安定化効果を示した。この原因として、Arg337 と Asp352 間の水素結合が失われることが示唆された。このメチル化による p53 活性の制御機構として、四量体構造の安定性を適切な制御による、下流標的遺伝子の選択的転写活性化モデルを構築した。

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。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大腸菌発現系において、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、幅広い熱力学的安定性を示す癌抑制タンパク質 p53 の四量体形成ドメイン点変異体を利用した。構造安定性の指標となる  $\Delta G_u$  が 100 kJ/mol 以下の変異体では、大腸菌における発現がほとんど見られなかったが、それ以上の安定性を有する変異体では、発現量と安定性が、正の相関を示した。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、実質的な発現のために、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。これらの細胞の分化、脱分化を効率よく行うためには、癌抑制タンパク質 p53 の一過的な不活性化が必要である。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、ヘテロ四量体形成を介して、濃度依存的に p53 依存的な転写活性化能を阻害した。

第五章では、本研究を総括し、従来の p53 に関する研究と合わせて議論することで、細胞内 p53 機能には、発現量の増加や安定化などの正の方向だけでなく、不活性化や不安定化による負の方向も合わせた、精密な制御機構が必要であることを示唆している。

以上、本研究では、p53 の四量体形成制御機構において、これまで不明であった翻訳後修飾による制御機構および四量体構造とタンパク質発現量との相関を明らかにし、さらに、p53 機能制御の為の、ペプチド阻害剤の開発にも成功した。本研究で得ら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、細胞内でのタンパク質機能の解明に大きく貢献することが期待される。関連原著論文は2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、著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認める。