



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Inactivation of Tumor Suppressor Protein p53 Transcriptional Activity by Gene Mutation and Starvation Stress [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	戸口, 侑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13237号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70132
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yu_Toguchi_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 戸 口 侑

学 位 論 文 題 名

Study on Inactivation of Tumor Suppressor Protein p53 Transcriptional Activity
by Gene Mutation and Starvation Stress

(遺伝子変異と飢餓ストレスによる癌抑制タンパク質 p53 の転写活性化能の不活性化に関する研究)

癌抑制タンパク質 p53 は、遺伝毒性ストレスをはじめとした様々な細胞ストレスに応答して、標的遺伝子の転写調節などを介してアポトーシスや細胞周期停止、DNA 修復、細胞老化などの主要な細胞応答経路のハブとして働く重要なタンパク質である。細胞ストレスに応答した p53 は、リン酸化をはじめとする多くの翻訳後修飾により、安定化・四量体化・活性化する。C 末端領域の四量体形成ドメインを介した四量体化は、p53 タンパク質の機能発現に必須である。p53 をコードする TP53 遺伝子の変異は、ヒトの悪性腫瘍において最も頻繁に報告されており、変異による p53 タンパク質の不活性化は細胞癌化の引き金となっている。p53 の対立遺伝子の変異により、野生型 p53 と変異型 p53 が共発現したとき、p53 は野生型-変異型間でヘテロ四量体を形成する。形成されたヘテロ四量体はドミナントネガティブ効果によって、四量体中に含まれる野生型 p53 の機能が喪失すると考えられている。また、p53 の四量体形成ドメインペプチドの細胞内への導入により、一過的な p53 転写活性化能の抑制が可能であることも報告されている。しかしながら、細胞内でのヘテロ多量体活性種の機能解析は非常に困難であり、その詳細な実態は不明である。

癌細胞は、腫瘍の形成過程でその迅速な細胞増殖により、頻繁に低栄養環境にさらされていることが分かっている。この低栄養環境は、癌細胞にとって飢餓ストレスとなる。特に、癌細胞の増殖にはアミノ酸が非常に重要であることが示唆されているが、アミノ酸欠乏による飢餓ストレスに対する p53 応答は不明な点が多い。細胞癌化を理解する上で、飢餓ストレスに応答する細胞制御メカニズムを理解することは極めて重要であり、癌治療の観点からも p53 タンパク質を介した飢餓応答の機構解明が望まれている。

本研究では、細胞癌化過程における癌抑制タンパク質 p53 の不活性化について、p53 ヘテロ多量体の細胞内での転写活性化能の解析、およびアミノ酸欠乏による飢餓ストレスが p53 応答に及ぼす効果について研究を実施した。

本学位論文は全 4 章より構成されている。第 1 章では総括的な序論として、本研究の背景や目的を述べている。p53 の癌抑制タンパク質としての機能、癌における TP53 遺伝子の変異、癌細胞の特質について概説した。

第 2 章では、野生型と変異型によるヘテロ多量体 p53 の転写活性化能の解明を目的とし、p53 レポーターシステムを用いたシングルセル解析について述べている。本研究では、所属研究室で開発した p53 の転写活性化能を解析するレポーターアッセイ系を基盤として、蛍光タンパク質を用いることにより野生型と変異型によるヘテロ多量体 p53 の転写活性化能を解析する新規アッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いて、野生型 p53 を発現誘導した

細胞に変異型 p53 を導入し、p53 特異的転写活性の定量的解析を行った。従来の研究における変異型 p53 によるドミナントネガティブ効果の解析は、過剰発現レベルでの解析に限られており、生理的タンパク質レベルにおけるシングルセルでの定量的な解析はなかった。本研究において、野生型 p53 に対する変異型 p53 および、p53 ペプチドの量を定量的に解析することで、ヘテロ多量体 p53 の転写活性化能を算出することに成功した。その結果、変異型 p53 および、DNA 結合ドメインを含まない p53 の四量体形成ドメインを含むペプチドの共発現により p53 転写活性の低下が認められた。さらに、異なる p53 ペプチド発現レベルにおいて、野生型ホモ、変異型ホモおよび野生型-変異型からなるヘテロ四量体の各形成量比を考慮したモデルによりフィッティング解析を行った。その結果、DNA 結合ドメインを 2 つ以上有するヘテロ四量体 p53 は実質的な転写活性化能を持つことが示された (図 1)。これらの結果は、p53 ペプチドによる転写活性の阻害が有用であることだけでなく、不活性化型タンパク質によるドミナントネガティブ効果のメカニズムを解明する上での重要な知見になると考えられる。

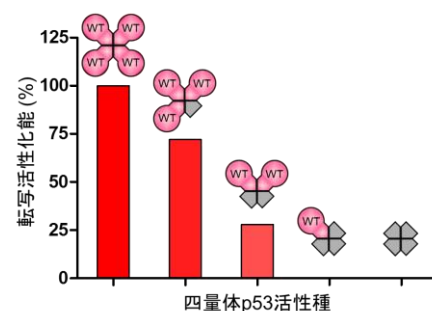


図 1 ヘテロ四量体 p53 の転写活性化能

第 3 章では、アミノ酸欠乏による飢餓ストレスに対する p53 応答について述べている。まず、癌細胞におけるアミノ酸の消費量を Jain らによって報告されている代謝産物プロファイルデータを用いて再解析を行った。その結果、癌細胞において必須アミノ酸の中でリジンが最も迅速に消費されていることが明らかとなった。p53 野生型の肺癌由来の A549 細胞において p53 の転写活性化能を解析するレポーターアッセイ系を構築し、培地に含まれる個々のアミノ酸を欠乏させたときの p53 転写活性化能について網羅的に解析を行った。その結果、非常に興味深いことに必須アミノ酸であるリジンの欠乏が、p53 の活性を最も強く抑制することを明らかにした。このことから、リジン欠乏が p53 不活性化を誘導することが示唆された。次に、p53 を活性化する抗癌剤であるエトポシドをリジン欠乏の細胞に添加すると、リジンの欠乏はエトポシドによる p53 の活性上昇についても強力に抑制することを明らかにした。また、リジン欠乏時におけるエトポシド添加の際、p53 活性化の指標となる 15 位のセリンのリン酸化レベルおよび、p53 のタンパク質量を解析した。その結果、リジン欠乏により、エトポシドによるリン酸化レベルの上昇が顕著に抑制され、またタンパク質量レベルも減少することが示された。このとき、TP53 遺伝子の発現量に変化がなかったことから、この効果は TP53 遺伝子の転写によるものではないことが示された。リジン欠乏とエトポシド添加条件における細胞死の割合を解析した結果、併用条件においてエトポシド添加単独で誘導される細胞死の割合が減少することが明らかとなった。さらに、リジン欠乏が細胞増殖に及ぼす影響を解析した結果、非常に興味深いことにリジン欠乏では増殖が抑制されるものの、その後通常培地に戻すと増殖が回復することが明らかとなった。さらに、リジン欠乏下で培養した細胞にエトポシド添加を行った条件において、リジン欠乏により、細胞老化が抑制されることが明らかとなった。これらのことから、リジン欠乏下に置かれた癌細胞は、p53 を介した細胞老化を回避していることが示唆された。以上、本研究により癌細胞はリジンの欠乏による飢餓ストレスに対して、p53 を不活性化することで、自身の生存を促進するメカニズムが存在することが示唆された (図 2)。

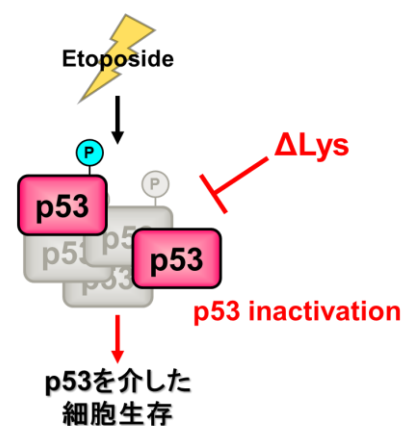


図 2 リジン欠乏による p53 不活性化を介した細胞生存

第 4 章では、本研究の総括的な結論を述べている。ヘテロ多量体の定量的な転写活性化能解析により、野生型 p53 を含む四量体においても転写活性化能が損なわれることが示された。また、アミノ酸欠乏における p53 応答の解析により、リジン欠乏による p53 不活性化に基づいた、癌細胞の抗癌剤抵抗性に対する新たなモデルを提示した。これらの p53 不活性化に関する研究は、細胞癌化のメカニズム解明に貢献するものであると考えられる。