



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_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 戸 口 侑

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	高 木 睦	「工学研究院 応用化学部門」
	副 査 教 授	石 森 浩一郎	「理学研究院 化学部門」
	副 査 特任准教授	今 川 敏 明	「理学研究院 化学部門」

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を担う最も重要なタンパク質である。細胞ストレスに応答した p53 は、安定化・四量体化・活性化する。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。TP53 遺伝子の変異は、悪性腫瘍において最も頻繁に報告されており、変異により発現する変異型 p53 と野生型 p53 からなるヘテロ四量体は、ドミナントネガティブ効果によって野生型 p53 の機能が喪失すると考えられている。また、p53 ペプチドによる多量体形成を介した一過的な p53 活性阻害が可能であることも報告されている。しかしながら、ヘテロ多量体活性種の機能解析は非常に困難であり、詳細な実態は不明である。また、癌細胞は、飢餓ストレスにつながる低栄養環境にさらされている。特に、アミノ酸が生存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く、癌の化学療法抵抗性の観点からも p53 を介した飢餓応答およびその機構の解明が望まれている。

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。

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、新規 p53 レポーターアッセイ系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ている。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 あるいは p53 四量体形成ドメインペプチドとの共発現により、内因性 p53 の転写活性が低下することを示した。この結果に対して、形成され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実施し、野生型を 2 個あるいは 3 個しか持たないヘテロ四量体 p53 が実質的

な転写活性化能を持つことを示した。この結果より、転写活性化の低下と細胞癌化の閾値が小さいことを示唆している。

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。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実施し、癌細胞において必須アミノ酸リジンが最も迅速に消費されていることを明らかにした。さらに、新規に構築した p53 転写活性を解析するレポーターアッセイ系により、各アミノ酸欠乏の p53 活性に対する効果を網羅的に解析した結果、リジンの欠乏が p53 の活性を最も強く抑制することを示した。加えて、リジン欠乏細胞への抗癌剤エトポシド添加において、リジン欠乏がエトポシドによる p53 の活性上昇についても強力に抑制するという極めて興味深いことを明らかにした。この効果が、p53 のタンパク質レベルおよびリン酸化レベルの抑制によるものであることを示した。さらに、細胞死の割合を解析した結果、リジン欠乏によりエトポシド誘導細胞死の割合が著しく減少することを明らかとした。さらに興味深いことに、リジン欠乏下で培養した細胞では、エトポシドによる細胞老化が抑制されていることを見出している。以上より、リジン欠乏下に置かれた癌細胞は、p53 不活性化を介した細胞老化を回避する新規モデルを示唆した。これらの結果は、癌の抗癌剤抵抗性の新規機構であり大きな意義を持つと考えられる。

第4章では、総括的な結論を述べている。従来のヘテロ多量体タンパク質の研究にはない、シングルセルでの生理的タンパク質レベルでの解析の重要性、およびリジン欠乏による p53 不活性化に基づいた、癌細胞の抗癌剤抵抗性の新たなモデルの詳細について述べている。

以上、本研究により、細胞癌化のメカニズム解明につながる変異型—天然型 p53 ヘテロ四量体形成による p53 ドミナントネガティブ不活性化機構について生細胞における定量解析に成功し、不活性化の閾値が小さいことを示唆した。さらに、リジン欠乏が p53 不活性化を介して癌細胞の抗癌剤抵抗性を示すモデルを提案した。これら p53 不活性化に関する研究は、細胞癌化の機構解明に新たな知見を与えるばかりでなく、癌治療法の発展に大きく貢献するものであると考えられる。本研究の一部は、原著論文として国際1報に報告されている。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。