HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Inactivation of Tumor Suppressor Protein p53 Transcriptional Activity by Gene Mutation and Starvation Stress [an abstract of entire text]
Author(s)	戸口, 侑
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/70133
Type	doctoral thesis
File Information	Yu_Toguchi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 約

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）

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。

癌細胞は腫瘍形成の過程で細胞増殖シグナルの維持、細胞死への抵抗性、エネルギー代謝異常など正常な細胞とは異なる様々な性質を獲得することが報告されている。細胞は、DNA ダメージや低酸素、栄養飢餓などの様々な細胞ストレスを受けたとき、p53 を中心とした多様な細胞応答を厳密に制御することで、そのゲノムの恒常性を維持している。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、主に転写調節因子として標的遺伝子に配列特異的に結合し、細胞周期停止や細胞老化、アポトーシスなどを誘導することで、細胞の癌化を抑制している。p53 は N 末端から、転写活性化ドメイン、プロリンリッチドメイン、DNA 結合ドメイン、四量体形成ドメイン、塩基性ドメインの 5 つのドメイン構造から構成されている。四量体形成ドメインを介した p53 の四量体化はその機能発現に必須である。p53 は、コンセンサス DNA 配列に対して、四量体中の各

DNA 結合ドメインが結合することで標的遺伝子の転写調節を行っている。

p53 をコードする *TP53* の遺伝子変異はヒトの悪性腫瘍においてもっとも頻繁に報告されている。そのため、細胞癌化のメカニズムを理解するうえで、p53 の機能解析は最も重要である。*TP53* 遺伝子の変異の中でも、一アミノ酸残基のみが変化するミスセンス変異が最も多いことが報告されている。特に、体細胞系列の変異においては、DNA 結合ドメイン中のホットスポットに集中している。R273H をはじめとするこれらの変異が、細胞癌化を誘発する原因となっている。初期の細胞癌化過程において、一方の p53 遺伝子に変異が生じたとき、ヘテロザイガスな遺伝子状態となる。このとき、それぞれの遺伝子から発現した野生型 p53 と変異型 p53 は、ヘテロ四量体を形成する。形成されたヘテロ四量体は、変異型 p53 によるドミナントネガティブ効果により、野生型 p53 の機能が阻害されると考えられている。しかしながら、p53 は単量体と四量体の平衡状態にあり、種々のヘテロ四量体を形成するため、不活性化のメカニズム解明は非常に困難である。そのため、癌化メカニズムを理解する上で生理的タンパク質レベルでのヘテロ四量体 p53 の活性解析が求められている。

一方で、p53 ペプチドを用いることで多量体化を介した p53 の一過的な活性阻害が報告されている。また、p53-p21 経路の活性化が、iPS 細胞の作製効率の低下を引き起こすことが報告されており、p53 ペプチドは p53 を不活性化する上で、有用なツールになることが期待されている。

エトポシドをはじめとする DNA 損傷薬剤は、p53 活性化を標的とした抗癌剤として広く用いられている。しかしながら、肺癌を含む複数の癌腫において、癌細胞がエトポシドに対する抵抗性を有することが報告されている。さらに、低栄養環境につながる腫瘍の中心部においては、薬剤の効果が低いことが報告されており、癌治療において、抗癌剤抵抗性のメカニズム解明が強く望まれている。

ところで、癌細胞は豊富に存在するグルコースやグルタミン以外の、他のアミノ酸を主要なタンパク質の構成因子として用いていることが報告されており、アミノ酸が癌細胞の生存に重要であることが示唆されている。また、癌細胞は正常な細胞と比べて増殖が活発であり、そのために低栄養環境に晒されている。実際の腫瘍においても、隣接する正常組織に比べて腫瘍組織におけるアミノ酸の濃度が低いことが報告されている。また、血管からの距離が遠い癌細胞が、抗癌剤への抵抗性を有することが明らかにされている。このことから、癌細胞

の栄養環境特異的な抗癌剤抵抗性のメカニズムが考えられる。p53 においてはグルコースや血清の欠乏による飢餓ストレスは、p53 活性化を介して解糖系の抑制や、オートファジーの誘導などの細胞応答に関わることが報告されている。アミノ酸の欠乏においてもセリンの欠乏が、p53 活性化をとおして代謝変化を誘導し、癌細胞の生存を促すことが報告されているが、アミノ酸欠乏による飢餓ストレスが p53 を介した細胞応答に及ぼす効果についてはまだ多くのことが分かっていない。

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。

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、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。このアッセイ系は、p53 欠損のヒト肺癌由来 H1299 細胞を用いている。テトラサイクリン誘導発現系により、生理的タンパク質レベルの黄色蛍光タンパク質 Venus を融合した野生型 p53 を発現し、プラスミドの一過的な導入により青色蛍光タンパク質 Cerulean を融合した変異型 p53 あるいは p53 ペプチドを発現する。また、コンセンサス配列を用いた p53 応答配列である *C3* により、赤色蛍光タンパク質 mCherry を発現する。3 種類の蛍光タンパク質を用いることにより、野生型 p53 と変異型 p53 のタンパク質量と p53 依存的な転写活性量をシングルセルで定量的に解析することが可能である。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。本系では、Venus を融合した野生型 p53、Cerulean を融合した DNA 結合ドメインに変異を有する変異型 p53R273H、また、DNA 結合能を持たないフラグメントとして、四量体形成ドメインを含む p53 の C 末端ペプチドを使用した。

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。

本章の結果は、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。

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。次にアミノ酸欠乏における p53 転写活性を詳細に解析するため、p53 野生型の肺癌由来の A549 細胞を用いてレポーターアッセイ系を構築した。本アッセイ系では、p53 標的遺伝子である *p21* 由来の転写活性量を黄色蛍光タンパク質 Venus でモニターする。また、*C3* を用いた特異的な p53 転写活性量を青色蛍光タンパク質 Cerulean によってモニターする。さらに、内部標準として p53 非依存的な転写活性を赤色蛍光タンパク質 mCherry によってモニターする。これにより、内因性 p53 由来の転写活性をより詳細に、個々の生細胞で定量的にモニター可能である。本系を用いて、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ところ、細胞が再増殖能を有する興味深い結果が得られた。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、リジン欠乏が細胞老化に影響を及ぼすことが明らかとなった。

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。

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。