HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Posttranslational Modification and Evolution of Tetramerization Domain in Tumor Suppressor Protein p53 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	中川, 夏美
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第14007号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78065
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Natsumi_NAKAGAWA_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　中 川　夏 美

学 位 論 文 題 名

Posttranslational Modification and Evolution of Tetramerization Domain
in Tumor Suppressor Protein p53
（癌抑制タンパク質 p53 における四量体形成ドメインの翻訳後修飾および進化）

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多様な細胞危機刺激に応答し,刺激を受けた細胞にアポトーシスや細胞周期停止などを誘導する。これより p53 はゲノムの完全性を維持しており,p53 機能は細胞癌化の抑制において最も重要である。p53 遺伝子である *TP53* は悪性腫瘍において最も頻繁に変異が報告されている。*TP53* の変異や欠失を持つ癌細胞は，放射線治療や抗癌剤による治療も p53 が制御するアポトーシスを誘導しないため，これらの患者は予後が非常に悪い。細胞ストレスに応答した p53 は，安定化・四量体化・活性化により転写活性化などの機能を発現する。この p53 機能は，50 残基以上もの残基におけるリン酸化・アセチル化・ユビキチン化・メチル化などの翻訳後修飾により精密に制御されている。p53 の機能発現には C 末端領域の四量体形成ドメインを介した p53 タンパク質のホモ四量体化が必須であり，p53 転写活性は四量体構造の安定性により一義的に決定される。p53 は単量体と四量体の平衡状態にあり，Human の四量体形成ドメインは βストランド，ターン，αヘリックスからなる。p53 四量体形成ドメイン中の翻訳後修飾による機能制御は不明な点が多く，この翻訳後修飾を介した詳細な制御機構の解明が求められている。p53 は，初期の脊椎動物である Lamprey（ヤツメウナギ）から哺乳類・鳥類に至るまで発現が見られる。脊椎動物進化においても p53 の役割は重要であるにも関わらず，p53 の機能や四量体構造の進化過程は明らかでない。配列の系統的解析のみならず，構造および機能の網羅的な解析が望まれる。

本研究では，p53 四量体形成ドメインの翻訳後修飾および進化過程における四量体構造の安定性変化を介した活性および機能制御に与える効果とその機構解明のため，四量体形成ドメインの Arg メチル化修飾による機能制御機構および脊椎動物における進化を解明する研究を実施した。

本学位論文は，全 5 章より構成されている。第 1 章では総括的な序論として，本研究の背景および目的を述べている。p53 の癌抑制タンパク質としての機能，p53 の四量体構造，脊椎動物の進化について概説した。

第 2 章では,p53 四量体形成ドメインのメチル化修飾による機能制御について述べている。p53 は翻訳後修飾によりその機能が調節されているが，四量体形成ドメインにおいては 3 つの Arg 残基のメチル化がある。タンパク質 Arg メチル基転移酵素 PRMT5 による p53 四量体形成ドメインのメチル化は，細胞周期停止を促進する一方，アポトーシスを抑制することが報告されている。メチル化による機能制御機構を明らかとするため，メチル化 p53 フラグメントの構造安定性解析と PRMT5 による *in vitro* methylation assay を実施した。Arg 残基のメチル化は，多量体構造を不安定化させ，特に 337 位の不安定化に対する寄与が大きかった。

nLC-MS/MS を用いて PRMT5 によるメチル化サイトを同定し，335 位のモノメチル化を開始とするメチル化カスケード機構の存在を明らかとした。以上の結果より，p53 四量体形成ドメインの構造安定性調節による新たな機能調節機構を示唆した。標的遺伝子の応答配列と p53 タンパク質との親和性は，細胞周期停止誘導性遺伝子で高く，アポトーシス誘導性遺伝子で低い傾向がある。p53 の応答配列結合による転写制御において，DNA bending の重要性が報告されており，細胞周期誘導性遺伝子では p53 とのアフィニティーが高いためメチル化により構造不安定化した p53 でも bending に耐えうるが，アポトーシス誘導性遺伝子では bending に耐えられないことが考えられる。

第 3 章では，哺乳類における p53 四量体形成ドメインの構造安定性の進化について述べている。哺乳類の p53 四量体形成ドメインの配列は，生物種によって 3-10 残基に置換がある。Human，Tree shrew（ツパイ），Guinea pig，Chinese hamster，Sheep，Opossum について，p53 四量体形成ドメイン 35 残基のフラグメントを合成し，CD spectrometry により多量体構造の熱安定性を解析した。Tree shrew はツパイ目に分類される哺乳類であり，日常的な飲酒，ヒトとチンパンジーにしか感染しないと考えられていた B 型肝炎への感染，霊長類に近いモデル動物としての利用など，Tree shrew の生態は非常に注目されている。その四量体形成ドメインは，Human と比較して 4 残基のみ置換があり，Human よりも多量体構造が安定であることが示された。変異体の解析により，安定化の原因となる置換は Q354M であることを明らかとした。四量体構造のホモロジーモデリングは，αヘリックスの C 末端に位置する M354 がもう一方の chain の Met 側鎖と新たな疎水性相互作用を形成し末端のヘリックス構造を安定化させていることを示唆した。アルコールの代謝物であるアルデヒドは DNA 損傷を引き起こすことが知られており，Tree shrew は安定な p53 を有しているため，飲酒に対するゲノムの安定性を維持可能であることが示唆された。

第 4 章では，より広範囲な解析による網羅的な脊椎動物における p53 四量体形成ドメインの構造・安定性・機能の進化について述べている。系統樹解析により，脊椎動物の p53 四量体形成ドメインは，同じく四量体を形成する p53 ファミリーである p63 および p73 の四量体形成ドメインと比較して，進化距離が長く，積極的に進化してきたことを示した。また，p53 の DNA 結合ドメインよりも四量体形成ドメインの方がより多様化していることが明らかとなった。無顎上綱，軟骨魚綱，条鰭綱，肉鰭綱，両生綱，爬虫綱，鳥綱，哺乳綱から，19 種類の生物種を選択した。Lamprey をはじめとして，多くの残基で置換があるにも関わらず，すべての生物種の四量体形成ドメインが，四量体を形成することが明らかとなった。さらに，それらの構造安定性解析およびキメラ p53 の転写活性解析を実施した。これらの結果より，Lamprey は構造安定性および活性が低く，Zebrafish などの魚類は C 末端側の第 2 ヘリックスの安定化効果により高い活性を有することが示された。一方で，陸への進出に至る Coelacanth から Human までの生物種は，第 2 ヘリックスの欠失にも関わらず第 1 ヘリックスの伸長等によって高い安定性を獲得したことが明らかとなった。脊椎動物は，水中から陸地への生活環境変化において，陸地における紫外線などの遺伝毒性ストレスに対して，安定な p53 を獲得した生物は適応に有利であった可能性が示唆された。本研究は，系統樹解析だけではなく，構造，その安定性，機能を統合的に研究した画期的なものとなった。

第 5 章では，本研究の総括的な結論について述べた。p53 四量体構造の安定性調節機構を明らかとすることは，細胞内での機能制御機構を考える上で非常に重要である。本研究では，p53 四量体形成ドメインのメチル化によって構造安定性が調節されることを明らかとし，応答配列との親和性の差と四量体構造安定性の調節を利用した標的遺伝子選択制御モデルを提案した。さらに，脊椎動物全体で発現するタンパク質を対象とし，系統樹インフォマティクス解析のみならず，構造安定性および細胞機能解析を初めて実施し，脊椎動物の p53 四量体形成能が環境順応と種の進化において極めて重要な役割を果たしたことを示唆した。