



Title	Effects of Evolutionary Changes and Mutations on Tetramer Formation and Function in Tumor Suppressor Protein p53 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	坂口, 周弥
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第15862号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92304
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SAKAGUCHI_Shuya_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 坂口 周弥

学 位 論 文 題 名

Effects of Evolutionary Changes and Mutations on Tetramer Formation and Function in Tumor Suppressor Protein p53

（癌抑制タンパク質 p53 における四量体化ドメインの
進化による変化および変異が四量体形成と機能に及ぼす影響）

癌抑制タンパク質 p53 は、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。これにより 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。多様な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。このため、p53 遺伝子 *TP53* の変異は最も高頻度で多種多様な腫瘍において見出される。

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安定性と強く相関している。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。p53 は単量体と四量体の平衡状態にあり、Human の p53 四量体形成ドメイン（p53TD）は β ストランド、ターン、 α ヘリックスからなる。一方、Zebrafish などの魚類においては、C 末端側に第 2 ヘリックスを有することが報告されている。p63 と p73 は、p53 ホモログであり、主として p63 は外胚葉性器官の発生や分化に、p73 は神経系の発生、炎症などに関与していることが明らかになっている。また、Human において p63 と p73 はヘテロ四量体を形成し、お互いを負に制御するが、p53 は p63 や p73 とはヘテロ四量体を形成しないことが知られている。脊椎動物進化において p53 ファミリーの役割は重要であるにも関わらず、これらの四量体構造の進化過程における安定性変化やそれが及ぼす機能への影響は明らかでない。このため p53 四量体構造に基づく分子機構の解明が望まれている。

本研究では、悪性腫瘍中の変異および進化過程における p53 四量体形成ドメイン配列の置換が、四量体形成、その構造安定性、さらにはヘテロ四量体形成に及ぼす効果を解析し、p53 ファミリーの特異的機能における四量体形成能の役割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。癌抑制タンパク質 p53 およびそのホモログである p63 と p73 タンパク質の機能、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、癌抑制タンパク質 p53 を原因遺伝とする Li-Fraumeni 症候群（LFS）および Li-Fraumeni 様症候群（LFL）における p53 四量体形成ドメインの変異におけるドミナントネガティブ効果について述べている。LFS および LFL は、生殖細胞系列における癌抑制タンパク質 p53 をコードする *TP53* のヘテロ接合性変異が原因で起こる遺伝子疾患であり、その患者は若年性癌を多発する。本研究では、まず蛍光タンパク質である Cerulean および Venus を融合した p53 を細胞内で発現させ、FRET により野生型（WT）—変異型間のヘテロ多量体量を定量化し、同時に mCherry 蛍光レポーターシステムにより p53 転写活性を解析可能な実験系を構築した。本系を用いて LFS および LFL 関連 p53TD 変異体について、野生型 p53 とのヘテロ多量体形成能とその転写活性を解析した。その結果、R337C および R337H 変異体の WT との

ヘテロ多量体形成能は大きな変化しない一方、WT と比較してその転写活性は著しく減少することが示された。さらに、これら LFS 関連 p53TD 変異体は、細胞周期停止に関わる p21 応答配列に比べ、アポトーシス誘導性 bax 応答配列に対してより顕著な活性低下を示すことが明らかとなった。以上の結果から、TD 変異によるドミナントネガティブ様効果が存在することを示した。また、変異による活性低下が、単なる四量体形成量の減少だけでなく四量体構造の不安定化に伴うものであり、LFS および LFL 細胞は p53TD 変異により細胞周期停止よりもアポトーシスの誘導能が低下しているモデルを示唆した。

第 3 章では、哺乳類進化における p53TD の構造安定性の種における差異とその要因の解明について述べている。哺乳類の p53TD は、アミノ酸配列において高い相同性を有しているにもかかわらず、Tree shrew の p53TD はヒトよりもかなり熱安定性が高いことが報告されている。本研究では、6 種の哺乳動物モデル生物 (Human, Tree shrew, Guinea pig, Chinese hamster, Sheep, Opossum) の p53TD の特性を比較した。その結果、Tree shrew と Opossum の p53TD はヒトの p53TD よりも有意に安定であることが示された。Tree shrew と Opossum の p53TD の結晶構造解析から、Human の p53TD の F341 と Q354 に相当するアミノ酸残基の置換が、四量体構造中の疎水コアのパッキングを顕著に変化させ、安定性を変化させていることが明らかとなった。このことは、M340 の酸化速度が Human p53TD と比較して Tree shrew の方が遅いという結果によっても支持された。これらの結果より、p53TD の配列の微妙な変化が、p53 タンパク質の安定性を劇的に変化させ、機能活性に重要な変化をもたらす可能性があることを示唆した。また、哺乳類における四量体形成安定性の獲得が種の体温および体温変化に基づく酸化ストレスに対して優位に働く可能性を示唆した。

第 4 章では、脊椎動物の中でも魚類における p53 および p63 の四量体形成ドメインの構造およびその安定性、さらに p53-p63 ヘテロ四量体形成の解析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、p63 および p73 の四量体形成ドメインと比較して、積極的に進化してきたことが示されている。本研究では、まず魚類を中心に p63 の結晶構造と安定性を解析した。その結果、Zebrafish p63TD 構造は、Human p63TD と高い類似性を有するが、興味深いことに Cys303 がホモ二量体間の β シート上において S-S 結合を形成していることが明らかとなった。この結合が Zebrafish p63TD の著しい安定性の要因であることが示唆された。この Cys 残基は条鰭綱でのみ高く保存されており、Gar においても S-S 結合を形成することが強く示唆された。一方 Coelacanth p63TD の構造は、Human p63TD と比較すると、第 2 ヘリックスが 3, 4 アミノ酸残基、また β シートが 2 アミノ酸残基短いことが明らかとなり、これが Coelacanth の低い安定性の原因であることが示唆された。さらに、魚類における p53-p63 間のヘテロ四量体形成能の解析を実施した。その結果、極めて興味深いことに初期魚類の Lamprey および Gar においてヘテロ四量体を形成するが、Coelacanth ではヘテロ四量体形成はないことが明らかとなった。さらに NMR 解析により Gar の p53-p63 は安定なヘテロ四量体形成を形成し、この条件では 3 分の 2 の分子がヘテロ多量体化していることが示唆された。以上の結果より、魚類の進化課程において p53 は p63 とのヘテロ四量体形成能を喪失し、これが癌抑制タンパク質 p53 の細胞危機ストレス応答という特異的機能の獲得に有効であった可能性が考えられる。

第 5 章では、本研究の総括的な結論について述べている。本研究では、p53 および p63 における新規な四量体構造および安定性の構造的要因を明らかとした。さらに、腫瘍における p53 四量体形成ドメイン変異体が多量体形成を介したドミナントネガティブ様機構を示すことを初めて示唆し、Li-Fraumeni 症候群の細胞癌化モデルを提唱した。また進化課程における p53 の他 p53 ファミリーとのヘテロ四量体形成ヘテロ形成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。以上本研究により、p53 ファミリーの四量体形成の機能発現における重要性和四量体形成における安定性とヘテロ形成性の分子機構を明らかにした。本研究は、他の多量体形成タンパク質の機能制御や進化に対しても新たな知見を与えるものと考えられる。