

がん抑制タンパク質 p53 の機能喪失につながる新規機構解明

国立大学法人 東海国立大学機構 名古屋大学
大学院創薬科学研究科 助教 日比野 絵美

1. 研究の背景・目的

がん抑制タンパク質 p53 は転写因子であり、DNA が損傷した際に DNA 修復を誘導し、修復が困難であればアポトーシスを誘導することで細胞のがん化を防ぐ機能を有している、言わば「ゲノムの番人」である。がんの約半数で p53 の機能喪失が見られ、p53 の機能を保持することはがん予防の観点から非常に重要である。しかしながら、p53 の補充療法では顕著な抗がん作用見られず、p53 をターゲットとした研究は進んではない。

その原因として、p53 の凝集体形成能の関与が示唆されてきた。p53 の有する DNA 結合ドメインは凝集することが報告されている。さらにがん細胞で見つかるようなホットスポット変異の導入により、凝集性が著しく上昇することもわかっている。加えて、機能を有する p53 は凝集体に取り込まれると機能を喪失することが報告されている。そのため、がん細胞で p53 を補充しても p53 の本来の機能が発揮されない。さらに大きな問題は、複数の形態の凝集体が同時生成することである^{1,2}。よって凝集体の詳細な解析が進まず、p53 をターゲットとした研究が難航している。

p53 をターゲットにすることで、半数のがんを治療対象にできる。また、細胞が本来有している機構を活用する、すなわち「ゲノムの番人」の復活させることによる抗がん効果であるため、正常細胞への副作用も少ないことが予想される。本研究の目的は、p53 の形成する複数の凝集体の形成メカニズムを解明することである。

2. 研究の対象ならびに方法

p53-DNA 結合ドメイン (p53C) の野生型 (p53C-wt) および R175H 変異型 (p53C-R175H) タンパク質は GST 融合型として大腸菌発現系にて作製した。GST タグアフィニティー精製後、HRV3C プロテアーゼにて GST タグを切断し、サイズ排除クロマトグラフィーにて最終精製した。

p53C-wt および p53C-R175H は、氷上で調製し、37°C に置くことで凝集させた。p53C の凝集は、(1) 蛍光色素の蛍光強度変化、(2) ナノ粒子トラッキング解析、および (3) 蛍光顕

微鏡観察にて検出した。

(1) 蛍光色素 8-(phenylamino)-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) は、アモルファス凝集体の検出に使用される。Thioflavin T (ThT) は、アミロイド凝集体の検出に使用した。4 μ M タンパク質に ANS および ThT をそれぞれ 10 μ M および 20 μ M となるように添加し、37°C にて蛍光波長 445 nm の励起スペクトルを2分ごとに1時間まで F-7000 蛍光分光光度計 (Hitachi) により取得した。ANS 蛍光値は 375 nm、ThT 蛍光値は 445 nm の値を抽出した。

(2) 37°C で1時間インキュベート後、ナノサイト NS300 (Malvern) にて、各サンプル5回ずつ計測した。

(3) 4 μ M タンパク質に ANS および ThT をいずれも 20 μ M となるように添加し、37°C で1時間インキュベートし、375 nm 励起フィルターおよび 488 nm 励起フィルターを使用し蛍光顕微鏡にて観察した。

p53C の構造転移は、(4) $^1\text{H-NMR}$ および (5) トリプトファン蛍光測定により検出した。

(4) pH7.3 の 20mM リン酸および 10% (v/v) D_2O 緩衝液中の 15 μ M p53C 溶液を 37°C でインキュベートし、氷上に再度置くことで凝集を止めた。NMR 測定用のグルコースには重水素化グルコース (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA) を使用した。 $^1\text{H-NMR}$ は、900MHz NMR 分光器 (Avance III; Bruker, Karlsruhe, Germany) ・三重共鳴クライオプローブで測定した。測定温度は 15°C。

(5) p53C のチロシンとトリプトファンの蛍光強度は、F-7000 蛍光分光光度計でモニターした。p53 タンパク質の濃度は 4 μ M とした。励起波長を 280 nm とし、2分ごとに1時間、蛍光スペクトルを取得した。測定後、305 nm の値に対する 333 nm の値の比を算出した。

p53C の機能はゲルシフトアッセイにより評価した。

p53 と結合する DNA は、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて AGGCATGCCTAGCATGCCT³ を pGEX-6P-3 に導入することにより調製した。この配列を含む 100bp の DNA を PCR により増幅し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) を用いて精製した。4 μ M の p53C の溶液を 37°C でインキュベートし、適当な時間に1部をサンプリングして氷上に置いた。全てのサンプリング終了後、20 ng の 100 bp DNA を加え、6% TBE ゲルに電気泳動した。ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、LED トランスイルミネーター (GELmieru ; 富士フイルム和光、大阪) で検出した。バンド強度は ImageJ ソフトウェアで解析した。

3. 研究結果

(1) KCl は p53C-R175H のアミロイド凝集を促進した p53C-wt と p53C-R175H の凝集に、細胞内のオスモライトの一種である KCl の存在が及ぼす影響を検討した。その結果、ANS の蛍光強度の増加は著しく抑制された。p53C-wt では ThT の蛍光強度が KCl により増減することはなかったが、p53C-R175H では KCl の濃度依存的に ThT の蛍光強度が増加した (図 1A-D)。

400 mM KCl の有無による凝集体形成の違いを明らかにするために、ANS と ThT で染色した凝集体を蛍光顕微鏡で観察した (図 1E-H)。ThT で染色された凝集体は p53C-wt、p53C-R175H とともに非常に少なく、10 倍拡大した蛍光顕微鏡では確認できなかったが、ANS で染色された凝集体は確認することができた。KCl 非添加下で確認できた凝集体は、400 mM KCl 添加では非常に少なかった。このことから、蛍光光度計で確認できた ANS 蛍光の減少は、凝集体の形成阻害によるものであることが強く示唆された。

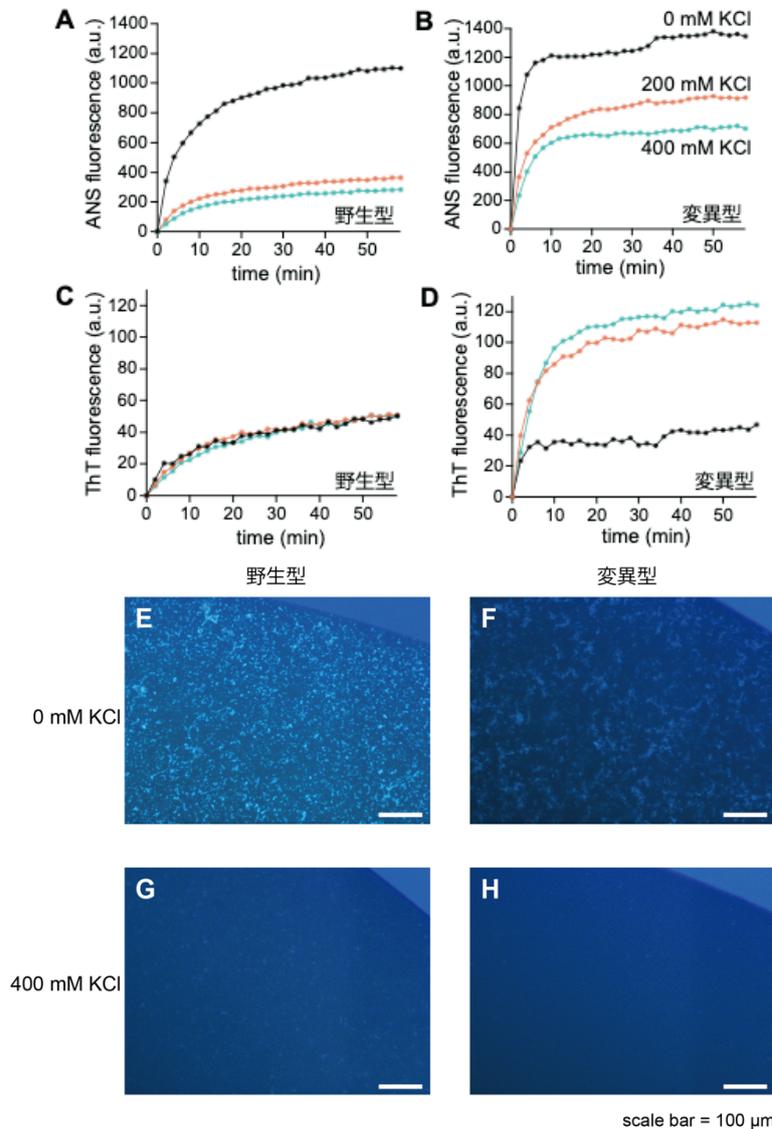


図 1A-D 蛍光光度計によるモニタリング。野生型の ANS 蛍光 (A) と ThT 蛍光 (C) および変異型の ANS 蛍光 (B) と ThT 蛍光 (D)。

E-H 蛍光顕微鏡による凝集体の観察。0 mM KCl 下の野生型 (E) と変異型 (F) および 400 mM KCl 下の野生型 (G) と変異型 (H)。

さらに凝集体の大きさを詳細に解析するために、ナノ粒子トラッキング解析を行った。その結果、p53C-wt においても p53C-R175H においても凝集体の大きさが 400 mM KCl の存在により減少することが確認できた (図 2)。

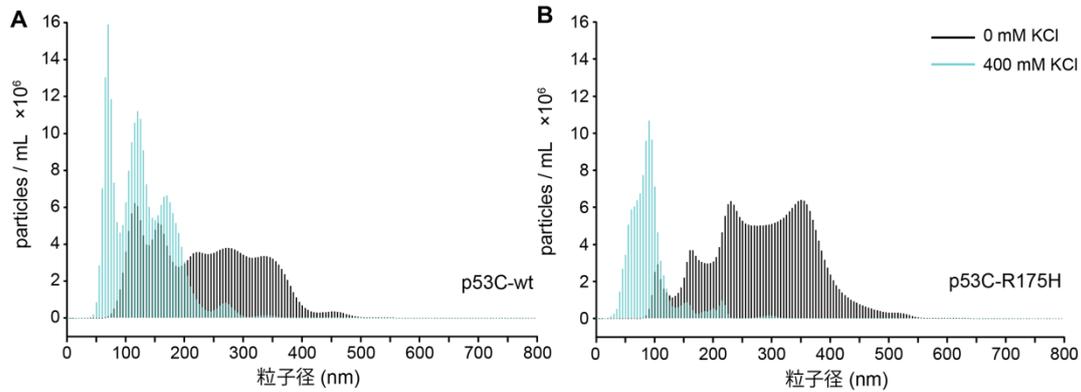


図 2 p53C の凝集体のナノ粒子トラッキング解析

(2) KCl は p53C の構造転移を抑制した

p53C-wt と p53C-R175H の KCl による凝集の詳細を検出するために、一次元 1H-NMR スペクトルを取得した。NMR 実験では、凝集体は分子量が増加し、ピークがブロードになるため、単量体の構造を検出できるはずである。タンパク質のわずかな変化を捉えるために、タンパク質を構成するアミノ酸周辺の微妙な変化を反映するアミドプロトン領域に注目した。KCl を含まない p53C-wt と p53C-R175H の凝集に伴う構造変化をモニターした。添加物を含まない p53C-wt と p53C-R175H を比較すると、ピークパターンに大きな違いは見られなかったが、p53C-wt ではよりシャープなピークが観察された。p53C-wt、p53C-R175H ともに経時的にピーク強度が著しく減少したが、これは凝集による分子量の増加と移動度の著しい低下によるものと思われる。

400 mM KCl 条件下での p53C-wt と p53C-R175H のスペクトルのパターンは、凝集前の無添加条件下とは異なっていた (図 4 C と F)。400 mM KCl 条件では、無添加条件と

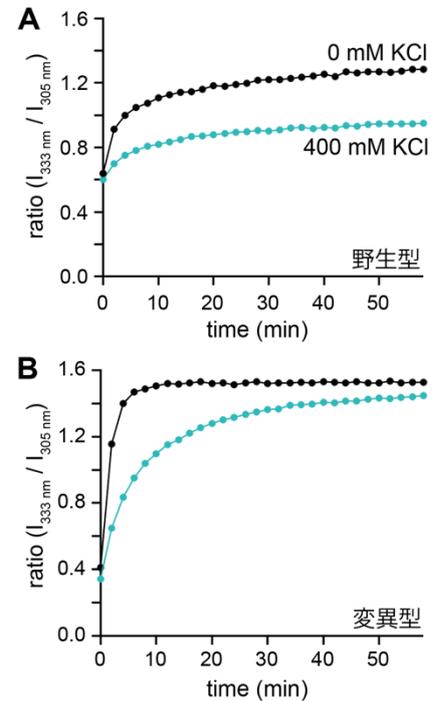


図 3 トリプトファン蛍光による構造転移のモニタリング
A, 野生型、B, 変異型

同様に凝集によるピーク強度の減少が見られたが、p53C-wt、p53C-R175Hともに凝集によるピークのパターンに変化はなかった。また、KClを添加したp53C-R175Hのピークは5分後でも観察可能であった。p53-wtとp53-R175HのDNA結合能はKClの添加により保持されたと考えられる。

また、トリプトファン蛍光測定による構造転移の検出もおこなった。その結果、KClはp53C-wtとp53C-R175Hの両方で構造転移を抑制することがわかった(図3)。これらの結果は、NMR実験結果と一致している。これらの結果は、KClがZnの消失による構造変化を阻害したことを示唆している。

(3) KClはp53Cの機能喪失を抑制した

p53は転写因子であるため、その機能にはDNAとの結合が不可欠である。このタンパク質とDNAの結合に対するKClの影響を評価するために、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、KClを添加したp53C-wtとp53C-R175Hは共にDNA結合能を保持した(図4)。

4. 考察

KCl存在下では、アモルファス凝集が抑制、アミロイド凝集が促進し、構造転移は抑制、機能喪失も抑制されることが判明した。これまで、p53はアミロイド凝集が機能喪失ひいてはがん化の要因の一つであると考えられていたが、本研究によりアミロイド凝集よりも構造転移して形成されるアモルファス凝集が機能喪失の要因であることが判明した。さらに興味深いことに、アミロイド凝集の形成と機能喪失は直結しているわけではないことも示唆された。今後は、今回得られた凝集と機能喪失の関係性に基づいて、さらにp53の機能回復法に焦点を当て研究を進めていく必要があるだろう。

5. 文献

1. Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils.

A.P.D.A Bom, L.P. Rangel, D.C.F.Costa, G.A.P. de Oliveira, D. Sanches, C.A. Braga, L.M. Gava, C.H.I.

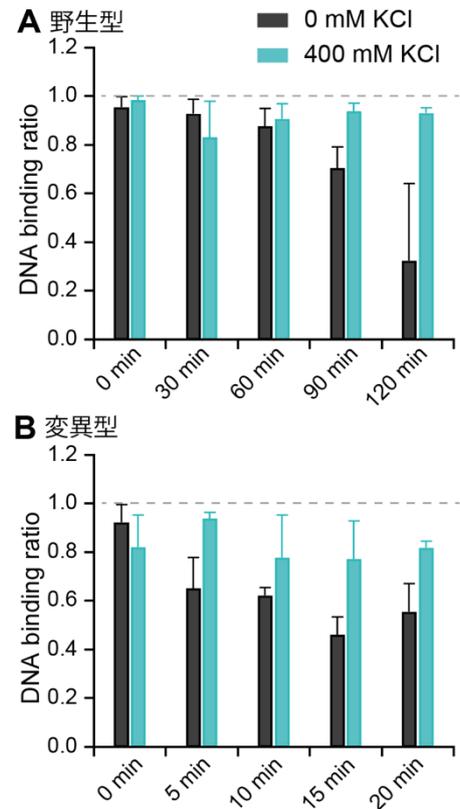


図4 DNA結合能評価
A, 野生型, B, 変異型

Ramos, A.O.T. Cepeda, A.C. Stumbo, C.V.D.M. Gallo, Y. Cordeiro and J.L. Silva, *J. Biol. Chem.* (2012) **287**:28152-18162.

2. p53 amyloid formation leading to its loss of function: implications in cancer pathogenesis.

S. Ghosh, S. Salot, S. Sengupta, A. Navalkar, D. Ghosh, R. Jacob, S.D.R. Kumar, N.N.J.S. Sahay, S. Mehra, G.M. Mohite, S.K. Ghosh, M. Kombrabail, G. Krishnamoorthy, P. Chaudhari and S.K. Maji, *Cell Death Differ.* (2017) **24**:1784-1798.

3. Crystal structure of the p53 core domain bound to a full consensus site as a self-assembled tetramer. Y. Chen, R. Dey and L. Chen, *Structure* (2010) **18**, 246–256.

6 .論文発表

原著論文

Relevance of amorphous and amyloid-like aggregates of p53 core domain to loss of its DNA-binding activity.

Hibino E, Tenno T and Hiroaki H., *Front. Mol. Biosci.* (2022), **9**:869851.

総説論文

Potential of rescue and reactivation of tumor suppressor p53 for cancer therapy.

Hibino E[#], Hiroaki H[#]. # co-corresponding author, *Biophysical Reviews* (2022), **14**:267–275.

学会発表

1) がん抑制タンパク質 p53 の凝集体形成と機能の相関解析

○**日比野絵美**、合田名都子、天野剛志、廣明秀一

第 21 回日本蛋白質科学会年会、オンライン、2021 年 6 月、ポスター発表

2) がん抑制タンパク質 p53 の凝集体形成と機能の相互関係分析

○**日比野絵美**、天野剛志、廣明秀一

第 10 回名古屋大学シンクロトロン光研究センターシンポジウム、オンライン、2022 年 2 月、ポスター発表

3)がん抑制タンパク質 p53 の凝集体形成と機能喪失は併発しない

○**日比野絵美**、天野剛志、廣明秀一

日本薬学会第 142 年会、オンライン、2022 年 3 月、口頭発表