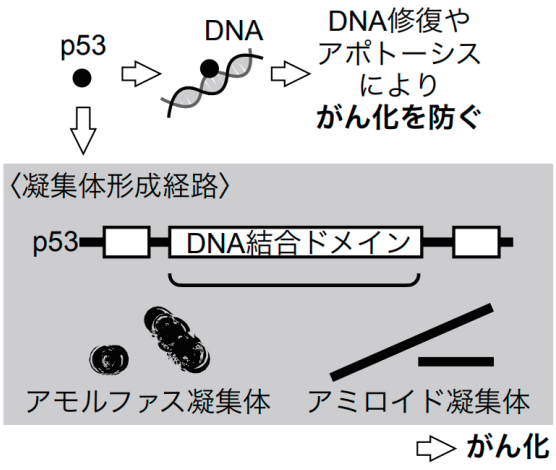
138　がん抑制タンパク質p53の凝集制御法の確立	日比野　絵美

【目的】がん抑制タンパク質 p53 は、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という機能を有しており、「細胞の番人」と呼ばれている（図）。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治療・予防の観点から非常に重要であるが、p53 をターゲットとした治療法の確立が難航している。p53 は、転写活性化ドメイン、DNA 結合ドメイン、四量体化ドメインからなるが、p53 の DNA 結合ドメインは凝集することが報告されており（図）、さらにホットスポット変異の導入により凝集性が高くなることも報告されている。このことから機能を有する p53 が、すでに形成された凝集体に取り込まれることで p53 の機能が喪失し、がん化する説が提唱されている。一方で、凝集体としては“アモルファス（不定形な）凝集体”や“アミロイド凝集体”など複数の形態の混合状態であることがわかっているものの、凝集体の形状が不均一であるため解析は進んでいないのが現状である。本研究では独自に発見した、p53 のアミロイド凝集体形成法により調製した p53 アミロイド凝集体の詳細な分析を行い、これまではアモルファス凝集体とアミロイド凝集体が同時に生成するために困難であった p53 アミロイド凝集体の分析を可能にすることである。これにより、がんにおける p53 アミロイド凝集体の関連が明らかとなる。

【方法】野生型 p53-DNA 結合ドメイン（p53-DBD）タンパク質は GST 融合型として大腸菌発現系にて作製、精製し調製した。試験管系での p53-DBD のアモルファス凝集体およびアミロイド凝集体は、蛍光色素 8-（phenylamino）-1-naphthalenesulfonic acid（ANS）および Thioflavin T（ThT）にてモニタリングした。また、SK-BR-3 細胞の p53 を、市販の p53 抗体 Pab240、DO-1、および自作 p53 アミロイド認識ポリクローナル抗体にて蛍光細胞免疫染色した。さらに、^{15}N 標識 p53 - DBD 溶液の^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを 900 MHz NMR 分光器（Avance Ⅲ、Bruker、Karlsruhe、Germany）・三重共鳴クライオプローブで取得した。

【結果】ANS の蛍光によりアモルファス凝集体を、ThT の蛍光によりアミロイド凝集体をモニターした。p53-DBD に試薬 A を添加することでアモルファス凝集体の形成が大幅に抑制されると同時にアミロイド凝集体の形成が大幅に促進されることを発見した。p53-DBD が形成するアミロイド凝集体をさらに詳細に分析するために、p53-DBD を認識可能なポリクローナル抗体を作出し、p53 の変異を有する培養がん細胞 SK-BR-3 細胞にて蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、市販抗体では見られない、細胞質に顆粒様の凝集体が確認できた。加えて、p53-DBD と試薬 A が直接相互作用するか確認するために、精製した^{15}N 標識 p53-DBD タンパク質溶液の^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを、試薬 A の添加前後で取得した。^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを比較したところ、多くのピークの変化が確認でき、試薬 A と p53-DBD の直接的な作用が示唆された。

p53の凝集体形成によるがん化メカニズムの概念図



138. がん抑制タンパク質 p53 の凝集制御法の確立

日比野　絵美

名古屋大学 大学院創薬科学研究科

Key words：がん抑制タンパク質 p53，アミロイド，細胞免疫染色，溶液 NMR

緒　言

がん抑制タンパク質 p53 は、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という機能を有しており、「細胞の番人」と呼ばれている（図 1）。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治療・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が見られないなど、p53 をターゲットとした治療法の確立が難航している。p53 は、転写活性化ドメイン、DNA 結合ドメイン、四量体化ドメインからなるが、がんで見られる p53 への点変異のホットスポットは DNA 結合ドメインに集中している。p53 の DNA 結合ドメインは凝集することが報告されており（図 1）[1]、さらにホットスポット変異の導入により凝集性が高くなることも報告されている [2, 3]。機能を有する p53 が、すでに形成された凝集体に取り込まれることで p53 の機能が喪失し、がん化する説が提唱されている。一方で、凝集体としては“アモルファス（不定形な）凝集体”や“アミロイド凝集体”など複数の形態の混合状態であることがわかっているものの、凝集体の形状が不均一であるため解析は進んでいないのが現状である。なお、アモルファス凝集体は変性したタンパク質が不規則に並んでできるものであり、アミロイド凝集体はタンパク質が規則的に並び、β シート構造が連なっている点が特徴である。アミロイド凝集体はアルツハイマー病やパーキンソン病の原因となっていると考えられている。

本研究では独自に発見した、p53 のアミロイド凝集体形成法により調製した p53 アミロイド凝集体の詳細な分析を行い、がんにおける p53 アミロイド凝集体の関連を明らかにするための礎を築いた。

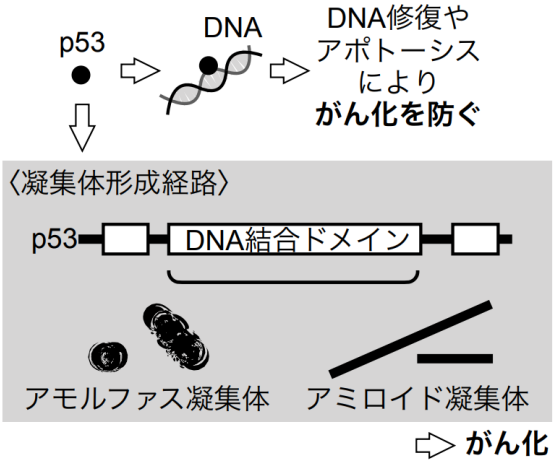


図 1. p53 の凝集体形成によるがん化メカニズムの概念図
p53 は通常転写因子として働きがん化を防ぐ機能を発揮するが、凝集体形成により機能を喪失しがん化につながる。また形成される凝集体はアモルファス凝集体とアミロイド凝集体の 2 種類が同時に生成すると言われている。

方　法

1. p53-DBD タンパク質試料調製

野生型 p53-DNA 結合ドメイン（p53-DBD）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。p53-DBD をコードするプラスミドを導入した大腸菌を LB 培地にて 37℃で振盪培養した。^{15}N 標識体を得る際は^{15}N 塩化アンモニウムを含有する M9 最少培地にて培養した。OD_{600}～0.4 で終濃度 3%となるようにエタノールを添加し培養温度を 20℃まで下げ 30 分間振盪培養したのち、OD_{600}～0.6 で終濃度 0.2 mM となるように IPTG を添加し 20℃で 18 時間培養し、菌体を得た。得られた菌体を超音波破砕し、20,000×g、4℃、20 分間遠心し得られた上清を GST タグアフィニティー精製した後、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。

2. 蛍光測定

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。蛍光色素 Thioflavin T（ThT）は、アミロイド凝集体の検出に使用される。4 μM p53-DBD タンパク質に ANS および ThT をそれぞれ終濃度 10 μM および 20 μM となるように添加し、37℃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。

3. 蛍光細胞免疫染色

SK-BR-3 細胞は、D-MEM（High Glucose；10% FBS、1%ペニシリン／ストレプトマイシン）培地にて、37℃、5% CO_2下で培養した。4%パラホルムアルデヒド／PBS（－）で細胞を固定したのち、0.5% Triton X-100／PBS（－）にて透過処理、3% BSA／PBS-T にてブロッキング後、一次抗体溶液（200 倍希釈）にて 4℃で 24 時間インキュベートし、二次抗体溶液（1,000 倍希釈）にて室温で 1 時間インキュベートした。DAPI 含有封入剤にて封入し、蛍光顕微鏡にて観察した。

4. 2 次元 NMR スペクトル測定

20 mM リン酸緩衝液（pH7.3；10 v/v% D_2O、50 μM ^{15}N 標識 p53-DBD 溶液）の^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルは、900 MHz 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 25℃とした。

結果および考察

1. 蛍光分光光度計による p53-DBD 凝集体のモニタリング

ANS の蛍光によりアモルファス凝集体を、ThT の蛍光によりアミロイド凝集体をモニターした。私は、オスモライトによりこれらの凝集体の形成割合が変化することから、これらは完全に同調して形成される訳ではないことを見出した［4］。さらに、p53-DBD に試薬 A を添加することでアモルファス凝集体の形成が大幅に抑制されると同時にアミロイド凝集体の形成が大幅に促進されることを発見した（図 2）。

この発見により、これまで混合状態で形成されてしまうがために困難であったアミロイド凝集体の分析が可能となった（2023 年 5 月特許出願予定）。

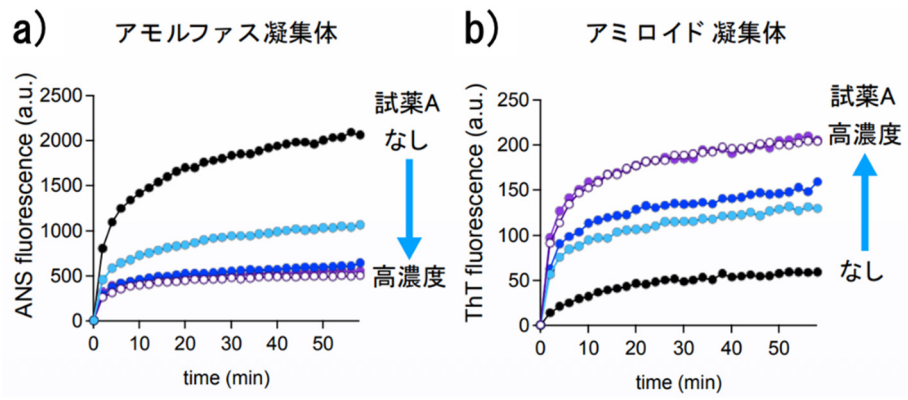


図 2. 試薬 A 添加時の p53-DBD の ANS 蛍光ならびに ThT 蛍光の経時変化

a) ANS 蛍光によるアモルファス凝集体のモニタリング。試薬 A 濃度依存的に減少した。

b) ThT 蛍光によるアミロイド凝集体のモニタリング。試薬 A 濃度依存的に増加した。

2. 蛍光細胞免疫染色による p53 アミロイド凝集体の検出

p53-DBD が形成するアミロイド凝集体をさらに詳細に分析するために、p53-DBD を認識可能なポリクローナル抗体を作出した。抗体は試験管系にて市販の p53 抗体と比較してアミロイド凝集体を検出可能であることを確認した。さらに、p53 の変異を有する培養がん細胞 SK-BR-3 細胞にて蛍光顕微鏡観察を行った（図 3）。その結果、市販抗体では見られない、細胞質に顆粒様の凝集体が確認できた。

さらなる検証が必要ではあるが、本自作抗体により培養細胞ひいては組織における p53 アミロイド凝集体の検出が可能となる可能性を秘めている。

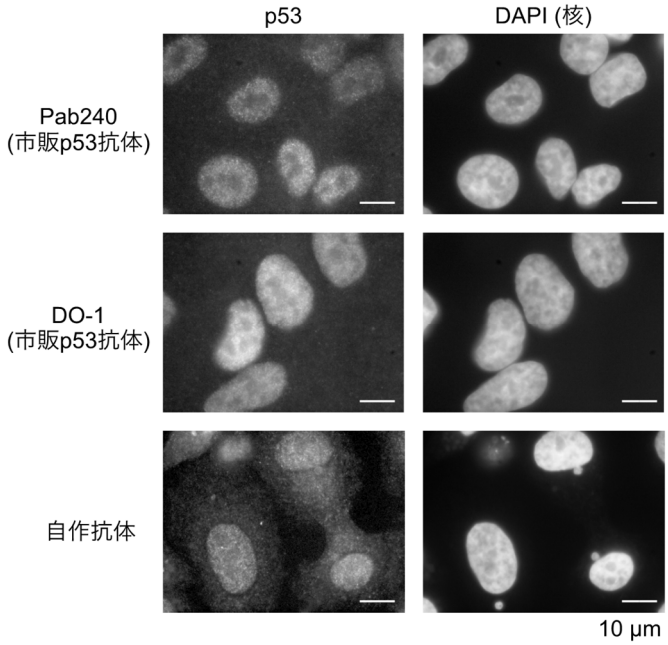


図 3. SK-BR-3 細胞の蛍光免疫染色

市販の p53 認識モノクローナル抗体である Pab240 抗体および DO-1 抗体、ならびに自作の p53 アミロイド認識ポリクローナル抗体にて免疫染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバー：10 μm。

3. 試薬 A と p53-DBD との相互作用検出

p53-DBD と試薬 A が直接相互作用するか確認するために、精製した ^{15}N 標識 p53-DBD タンパク質溶液の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを、試薬 A の添加前後で取得した（図 4）。^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルは 2 次元 NMR の一種であり、一つのピークが一つのアミノ酸残基に対応している。化合物の添加前後で NMR ピークが変化したか否かを見ることで、化合物がタンパク質に相互作用したかどうか判別可能となる。

試薬 A の添加前後における p53-DBD の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを比較したところ、多くのピークの変化が確認できた。この結果から、試薬 A は凝集前の p53-DBD に働きかけることでアミロイド凝集体に導くと考えられ、モノマーの時点での p53-DBD の構造がどちらの凝集体を形成するのか決める因子になりうることが示唆された。

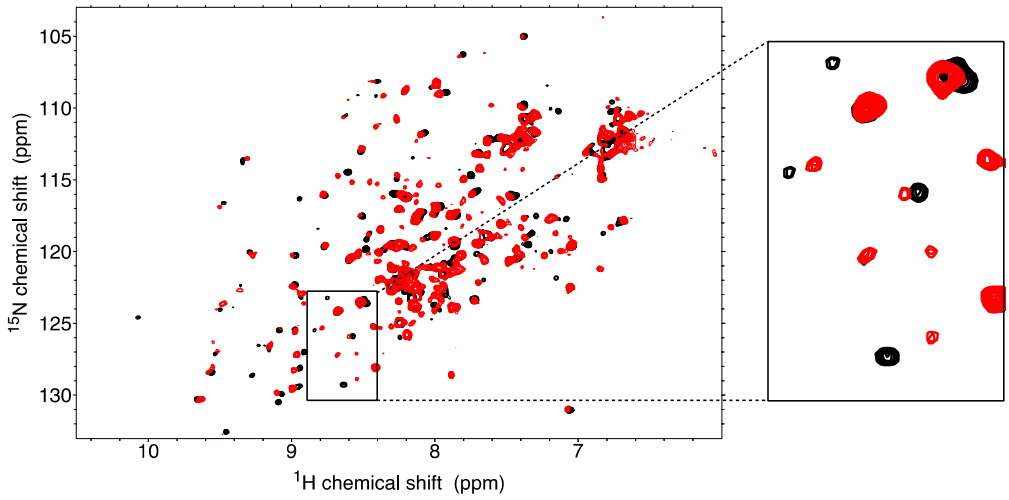


図 4. 試薬 A 添加前後での p53-DBD の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトル
試薬 A 添加前を黒、添加後を赤で示し、図中の枠内の拡大図を右側に示した。
多くのピークでシフトや消失、また新たなピークの出現が確認できた。

文　献

1) Ishimaru D, Andrade LR, Teixeira LS, Quesado PA, Maiolino LM, Lopez PM, Cordeiro Y, Costa LT, Heckl WM, Weissmüller G, Foguel D, Silva JL. Fibrillar aggregates of the tumor suppressor p53 core domain. Biochemistry. 2003 Aug 5;42(30):9022-7. PMID: 12885235 DOI: 10.1021/bi034218k

2) Ano Bom AP, Rangel LP, Costa DC, de Oliveira GA, Sanches D, Braga CA, Gava LM, Ramos CH, Cepeda AO, Stumbo AC, De Moura Gallo CV, Cordeiro Y, Silva JL. Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: implications for cancer. J Biol Chem. 2012 Aug 10;287(33):28152-62. Epub 2012 Jun 19. PMID: 22715097 DOI: 10.1074/jbc.M112.340638

3) Garg A, Hazra JP, Sannigrahi MK, Rakshit S, Sinha S. Variable Mutations at the p53-R273 Oncogenic Hotspot Position Leads to Altered Properties. Biophys J. 2020 Feb 4;118(3):720-728. Epub 2019 Dec 21. PMID: 31952808 DOI: 10.1016/j.bpj.2019.12.015

4) Hibino E, Tenno T, Hiroaki H. Relevance of Amorphous and Amyloid-Like Aggregates of the p53 Core Domain to Loss of its DNA-Binding Activity. Front Mol Biosci. 2022 Apr 26;9:869851. eCollection 2022. PMID: 35558561 DOI: 10.3389/fmolb.2022.869851