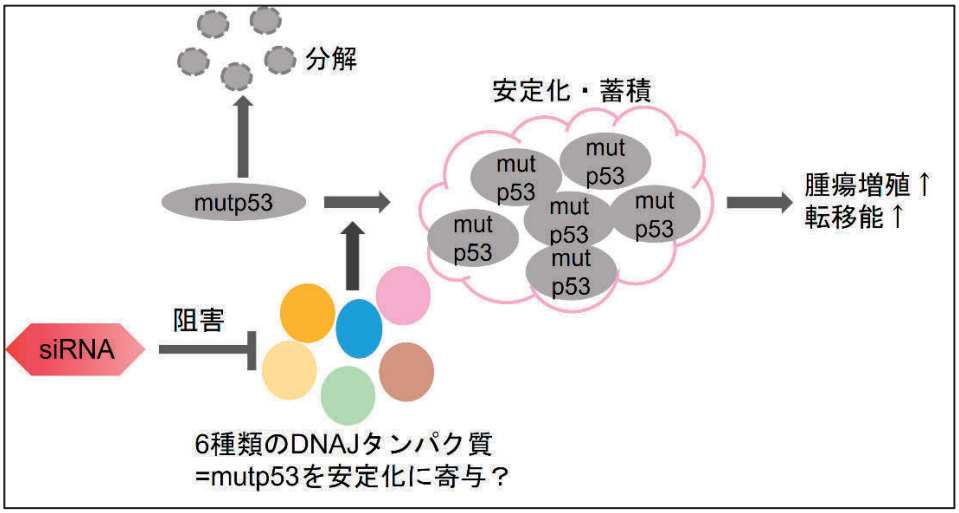
162　DNAJタンパク質による変異p53安定化機構の解明	戒田　篤志

【目的】頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）では、p53 の変異発生頻度は半数以上と非常に高く、予後不良との密接な関連があることが知られている。私が所属していた研究室では、HSP40 ファミリーのメンバーである DNAJA1 が、構造変異型 p53 と結合し安定化させることで、変異 p53（mutp53）の分解を抑制し、癌の転移を促進することを明らかにした。しかしながら、HSP40 ファミリーには J-domain を主体とした共通構造を有する 50 種類ほどのサブタイプ（DNAJ タンパク質）が存在し、DNAJA1 以外のどの DNAJ タンパク質が mutp53 の安定化およびその蓄積に関与しているかは明らかにされていない。そこで、本研究では、HNSCC 細胞株を用い、mutp53 を安定化する DNAJ タンパク質の有無について検討した。また、新たなスクリーニング手法の構築のため、mutp53 レポーターシステムの樹立を試みた。

【方法】細胞株は、ヒト HNSCC 細胞株であり、$p53^{C176F}$ を有する HN31 細胞を用いた。各 DNAJ タンパク質に対する siRNA を 2 種類ずつ設計し、siRNA ライブラリーを作製した。リポフェクション法による siRNA 処理後、蛍光免疫染色により p53 を染色し、ハイスループット顕微鏡システムを用い、検出および解析を行った。また、mutp53 レポーターシステムとして、ヒト HNSCC でよく観られる変異型である $p53^{R175H}$ を緑色蛍光タンパク質である AcGFP と融合したベクターを新規に構築し、p53 をノックアウトした HN31 細胞に導入、その有用性について検討した。

【結果】siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングにより、6 種類の DNAJ タンパク質に対する siRNA において p53 発現レベルを 30%以上抑制することが示された。また、新規に構築した mutp53 レポーターシステムを導入した細胞において、p53 が緑色蛍光として観察されること、p53 タンパク質が発現していることが示されたとともに、細胞遊走能およびコロニー形成能が上昇することを見出した。今後は、本研究にて抽出された mutp53 の安定化に寄与し得る DNAJ タンパク質について検証を進めていくとともに、新たに開発されたレポーターシステムを活用し、変異パターンに応じて安定化に寄与し得る DNAJ タンパク質に違いがあるか検討していく予定である。

変異 p53 の安定化および蓄積に寄与しうる DNAJ タンパク質の同定



162. DNAJ タンパク質による変異 p53 安定化機構の解明

戒田　篤志

*東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 口腔放射線腫瘍学分野

Key words：頭頸部がん，p53 変異，DNAJ タンパク質，がん転移

緒　言

頭頸部領域は、発語、摂食、嚥下等、生命を維持するための様々な機能を司る重要臓器である。この領域に生じる頭頸部がんへの主な治療法は、外科療法が第一選択肢となることが多いが、侵襲の程度によっては治療後の生活の質（QOL）が著しく低下することは避けられない。一方、化学療法などの非侵襲的治療法は、治療後 QOL を維持することが可能であり、特に近年、分子標的薬の出現に伴い、化学療法にかかる期待は日増しに大きくなっている。

癌抑制因子 p53 は、大半の癌で変異が生じており、変異 p53（mutp53）は癌抑制因子としての機能を喪失（Loss of function）しているのみならず、mutp53 が蓄積することにより、oncogene として癌の進行や転移を促す（Gain of function）ことが知られている。頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）では、p53 の変異発生頻度は半数以上と非常に高く、予後不良との関連についても報告されていることから、mutp53 は恰好の治療標的であると考えられ、実際に、mutp53 をノックダウンすることにより癌の進行や悪性度が顕著に抑制される［1］が、mutp53 を標的とした治療法は、有害事象の問題から未だ実用化には至っていない。

私たちのグループは、HSP40 ファミリーのひとつである DNAJA1 が、構造変異型 mutp53 と結合し、安定化させることで、mutp53 の分解を抑制し、癌の転移を促進することを明らかにした［2, 3］。しかしながら、HSP40 ファミリーには J-domain を主体とした共通構造を有する 50 種類以上のサブタイプ（DNAJ タンパク質）が存在し、どの DNAJ タンパク質が mutp53 の安定化およびその蓄積に関与しているかは分かっていない。そこで、本研究では、mutp53 の安定化に寄与しうる DNAJA1 以外の DNAJ タンパク質の有無について検討するとともに、今後のスクリーニングの効率化を図るために mutp53 レポーターシステムの構築を試みた。ヒト HNSCC 細胞株（$p53^{C176F}$）に各 DNAJ タンパク質に対する siRNA ライブラリーを処理し、ハイスループット顕微鏡を用いて p53 レベルの変化を解析したところ、6 種類の DNAJ タンパク質において siRNA 処理にて 30%以上の発現レベルの低下が認められた。また、新たに $p53^{R175H}$ と緑色蛍光タンパク質 AcGFP を融合したベクターを開発し、p53 ノックアウト細胞に導入したところ、mutp53 レベルの可視化ならびに細胞遊走能およびコロニー形成能の上昇が確認された。

方　法

1. 細胞株

本研究では、ヒト HNSCC を原発とした転移リンパ節由来の HN31 細胞（$p53^{C176F}$）、さらに HN31 細胞において CRISPR-Cas9 システムにて p53 をノックアウトした p53 KO 細胞［3］、p53 KO 細胞に緑色蛍光タンパク質 AcGFP と $p53^{R175H}$ を融合した $p53^{R175H}$ - AcGFP を導入した細胞（175-G 細胞）を用いた。いずれの細胞も 10%FBS およびペニシリン・ストレプトマイシンを含む DMEM を用いて培養した。

*現在の所属：東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 歯科放射線診断・治療学分野

2. siRNA による遺伝子発現抑制

トランスフェクション48～72時間前にHN31細胞を播種し、siRNAトランスフェクションにはLipofectamine RNAiMAX（Thermo Fisher Scientific）を用いた。トランスフェクション 24 時間後には培地交換を行った。

各 DNAJ タンパク質に対する siRNA を pre-designed Silencer Select siRNA（Thermo Fisher Scientific）より 2 種類ずつ選択し、DNAJ タンパク質への siRNA ライブラリーを設計した。なお、negative control siRNA およびポジティブコントロールとして *TP53* に対する siRNA も上記ライブラリー上に配した。

3. 蛍光免疫染色

細胞は 4%パラホルムアルデヒドにて 20 分間固定した。固定後、細胞は 0.5% Triton-X100 を含む phosphate-buffered saline（PBS-T）にて 10 分間透過化処理された。ブロッキングは 3% bovine serum albumin を含む PBS-T にて室温下で 1 時間行い、その後、抗 p53 抗体（DO-1、Santa Cruz Biotechnology）にて 4℃で一晩、一次抗体反応を行った。二次抗体反応は、Alexa488 anti-Mouse IgG 抗体（Thermo Fisher Scientific）にて室温にて 1 時間行い、DAPI にて核染色をした。siRNA ライブラリーにて処理された細胞は、カスタマイズされたハイスループット顕微鏡システム IMACS2（浜松フォトニクス）にて各 siRNA について核および p53 に対する画像を 9 視野ずつ自動撮影した。撮影された画像は、MetaMorph イメージングソフトウェア（Molecular Devices）にて 1 細胞あたりの蛍光強度を計測し、p53 発現レベルの平均値を算出した。ライブラリー以外で処理された細胞は、BZ-9000（KEYENCE）にてマニュアル撮影を行った。

4. 創傷治癒アッセイ

35 mm ディッシュ上に播種し、コンフルエントになった状態でディッシュ中央部分をピペットチップにてギャップを作製し、24 時間タイムラプスイメージングを行い、ギャップが閉鎖していく様子を観察した。経時的にギャップの面積を ImageJ ソフトウェアにて計測、開始時の面積から各時間の面積を差分した面積を閉鎖面積とし、開始時の面積によってノーマライズした。

5. コロニー形成アッセイ

規定数の細胞を播種し、約 2 週間培養しコロニーを形成させた。形成したコロニーはホルマリン固定後、クリスタルバイオレット染色を行い、コロニー数をカウントした。

6. 統計解析

各結果については、two-tailed Student's t 検定または two-way ANOVA にて統計解析し、$p<0.05$ を有意差ありと判定した。

結果および考察

1. siRNA ライブラリースクリーニング

私たちは、以前に変異 p53 の中でも構造変異型 p53 においては DNAJ タンパク質のひとつである DNAJA1 がその安定化に寄与していることを見出した［2, 3］。しかし、DNAJ タンパク質には約 50 種のサブタイプが存在し、一部については p53 との関連が報告されているものの未だ不明な点が多い［4］。そこで、構造変異型 p53 である $p53^{C176F}$ を有する HN31 細胞を、各 DNAJ タンパク質に対する siRNA ライブラリーにて処理し、その後、p53 に対する蛍光免疫染色を行うことで、DNAJ タンパク質の p53 発現への影響を網羅的に解析した。

ポジティブコントロールである *TP53* siRNA で処理すると、設計した 2 種類いずれにおいても著しい p53 レベルの低下が観察された（図 1、赤色）。また、すでに安定化への寄与が報告されている DNAJA1 についても 40～50%程度の発現低下が認められた（図 1、青色）が、興味深いことに、DNAJA1 以外にも 6 種類の DNAJ

タンパク質においていずれかの siRNA により 30%以上の発現低下が認められた。以上の結果は、DNAJA1 以外の DNAJ タンパク質も mutp53 の安定化に寄与している可能性を示唆している。しかし、本スクリーニング結果のみでこれらの DNAJ タンパク質に p53 との間に相互作用があるとは結論付けることはできず、蛍光免疫染色以外の方法（ウェスタンブロッティングなど）でも再現性を確認し、再現性のとれたタンパク質については mutp53 との結合の有無や悪性形質への影響についても示すことができれば、頭頸部がんにおける mutp53 を最終標的としたひとつのターゲットとして期待できるかもしれない。

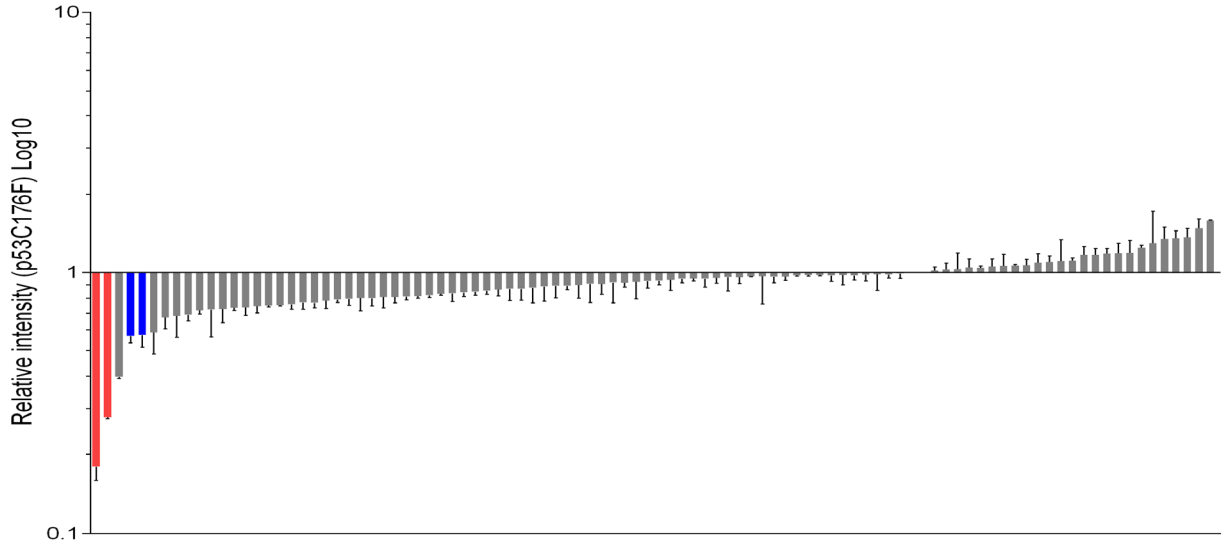


図 1. DNAJ タンパク質に対する siRNA ライブラリースクリーニング
各タンパク質に対する siRNA にて 72 時間処理し、蛍光免疫染色された p53 発現レベルを計測。ネガティブコントロールでの p53 発現レベルの平均値を 1 とし、それ以外の発現レベルを算出し、グラフ化、発現変化の高低順に並べた。各棒グラフが各 siRNA で処理された細胞における p53 発現レベルを示す。*TP53* または *DNAJA1* に対する siRNA で処理された細胞はそれぞれ赤色、青色で示されている。

2. 変異 p53 可視化細胞の樹立

様々な種類の変異 p53 についてより簡便にスクリーニングを進めるためにもレポーターシステムの開発が重要である。そこで、野生型 p53（wtp53）または構造変異型 p53 のひとつである $p53^{R175H}$ と緑色蛍光タンパク質 AcGFP との融合タンパク質を作製した（図 2a）。構築したベクターは p53 をノックアウトした HN31 細胞（p53 KO 細胞）に導入し、蛍光観察およびウェスタンブロットにて p53 タンパク質の発現を解析したところ、ベクターの導入が認められ、p53 可視化細胞の樹立が確認された（図 2b、c）。

3. レポーターシステムの導入による gain of function の誘導

p53 変異は、p53 としての本来の機能を失うのみではなく、がんの進行や転移を促進する新たな機能をもたらすことが知られており、それを gain of function と呼ぶ。p53 KO 細胞に $p53^{R175H}$ - AcGFP が導入されたことは確認されたが、さらに新たな形質獲得が生じているか否かを検討した。創傷治癒アッセイでは、175-G 細胞において有意に早くギャップ面積の減少が認められた（図 3a）。また、コロニー形成アッセイにおいても 175-G 細胞では、p53 KO 細胞と比較して、形成したコロニーの数が有意に多かった（図 3b）。以上より、175-G 細胞においては有意に細胞遊走能およびコロニー形成能が高いことが明らかになり、レポーターシステムの導入による gain of function の誘導が示された。

mutp53 レポーターシステムの導入により、mutp53 同様の形質が付与されることが示されたが、実際に

DNAJA1 などの DNAJ タンパク質をノックダウンすることで蛍光強度に変化が生じるかを検討することが喫緊の課題であり、それが解決することでスクリーニングへの応用が可能となる。また、本システムでは、融合する mutp53 の変異型を変えることで種類に応じて安定化に寄与しうる DNAJ タンパク質が異なるかも検討可能であり、機能的な確認がとれた上で今後は複数の変異型が異なるレポーターシステムを構築する予定である。

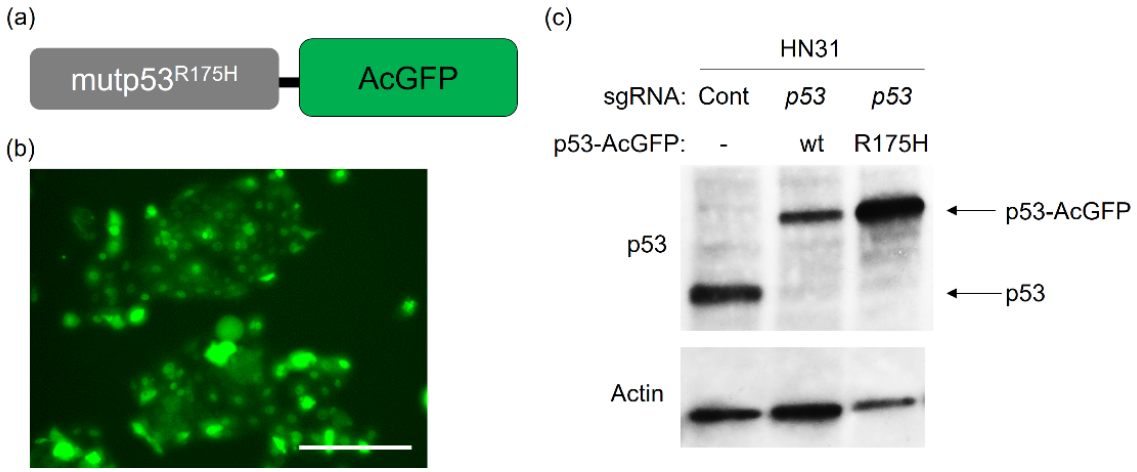


図 2. p53 レポーターシステムの導入

a) $p53^{R175H}$と緑色蛍光タンパク質AcGFPから構成される融合タンパク質（$p53^{R175H}$-AcGFP）。

b) $p53^{R175H}$-AcGFPが導入されたp53ノックアウトHN31細胞（175-G細胞）の蛍光画像（スケールバー：100μm）。

c) $p53^{R175H}$-AcGFP（右端）または野生型（wt）p53-AcGFP（中央）が導入されたp53ノックアウトHN31細胞におけるp53タンパク質の検出。コントロールとしてControl sgRNAが導入された細胞を用いた（左端）。ローディングコントロールとしてActinを使用した。

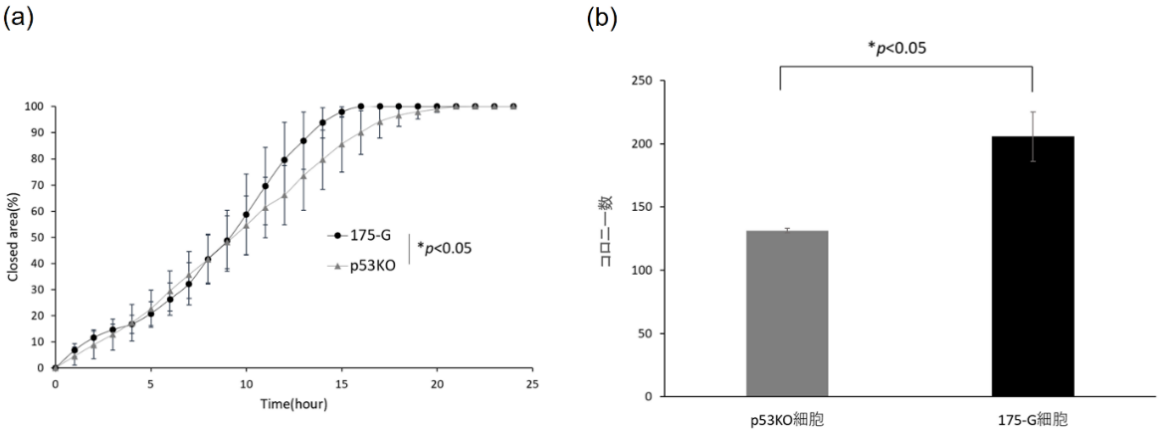


図 3. レポーターシステム導入による gain of function の誘導

a) 創傷治癒アッセイによる p53KO 細胞および 175-G 細胞における遊走能の評価。経時的なギャップ面積の変化を追跡したところ、175-G 細胞において有意に早く面積が縮小した。*p＜0.05（two-way ANOVA）。

b) コロニー形成アッセイによる p53 KO 細胞および 175-G 細胞におけるコロニー形成能の評価。p53 KO 細胞と比較して、175-G 細胞において有意にコロニー数は多い。*p＜0.05（two-tailed Student's t 検定）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、Children's Mercy Research Institute Division of Hematology & Oncology の岩熊智雄、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科歯科放射線診断・治療学分野の三浦雅彦である。この場をお借りして深く御礼申し上げます。

文　献

1） Iyer SV, Parrales A, Begani P, Narkar A, Adhikari AS, Martinez LA, et al. Allele-specific silencing of mutant p53 attenuates dominant-negative and gain-of-function activities. Oncotarget. 2016;7(5):5401-15. doi: 10.18632/oncotarget.6634. PubMed PMID: 26700961; PubMed Central PMCID: PMC4868694.

2） Parrales A, Ranjan A, Iyer SV, Padhye S, Weir SJ, Roy A, et al. DNAJA1 controls the fate of misfolded mutant p53 through the mevalonate pathway. Nat Cell Biol. 2016;18(11):1233-43. Epub 20161024. doi: 10.1038/ncb3427. PubMed PMID: 27775703; PubMed Central PMCID: PMC5340314.

3） Kaida A, Yamamoto S, Parrales A, Young ED, Ranjan A, Alalem MA, et al. DNAJA1 promotes cancer metastasis through interaction with mutant p53. Oncogene. 2021;40(31):5013-25. Epub 20210628. doi: 10.1038/s41388-021-01921-3. PubMed PMID: 34183772; PubMed Central PMCID: PMC8804903.

4） Kaida A, Iwakuma T. Regulation of p53 and Cancer Signaling by Heat Shock Protein 40/J-Domain Protein Family Members. Int J Mol Sci. 2021;22(24). Epub 20211216. doi: 10.3390/ijms222413527. PubMed PMID: 34948322; PubMed Central PMCID: PMC8706882.