

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2005-2008

課題番号：17590498

研究課題名（和文） 癌抑制遺伝子 p21 を癌の診断に利用するための基礎研究

研究課題名（英文） Basic study to utilize the tumor suppressor gene p21 for the diagnosis of cancer

研究代表者

福地邦彦 (FUKUCHI KUNIHICO)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：70181287

研究成果の概要：

癌抑制遺伝子のサイクリンキナーゼインヒビター-p21 の機能および発現制御機構解析を行った。細胞質局在の p21 は、アポトーシスを抑制した。基礎的な発現には、分子内の 15-48 アミノ酸領域が必須であり、この領域と WIPp39 をアダプターとして HSP90 が結合することで p21 の基礎的な発現が得られることを明らかとした。p21 の基礎発現は、DNA 損傷に即応するために必須であり、翻訳後制御解析の重要性が示された。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2005 年度 | 1,000,000 | | |
| 2006 年度 | 900,000 | | |
| 2007 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2008 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 総計 | 3,500,000 | | |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：(1)癌抑制遺伝子 (2)サイクリンキナーゼ (3)p21 (4)アポトーシス (5)プロテアソーム (6)細胞増殖、(7)癌 (8)蛋白安定性

1. 研究開始当初の背景

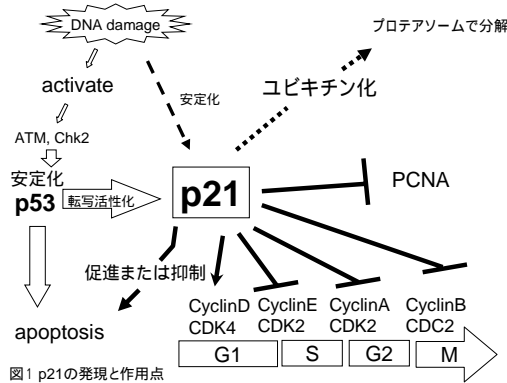
癌抑制遺伝子をマーカーとして利用した癌の予後診断が臨床応用され始めた。癌抑制遺伝子の p53 は、その変異がアポトーシス抵抗性に関連するため、化学療法、放射線療法抵抗性を示唆するため、変異の検出が治療方針において有用であると考えられた。正常型の p53 は癌抑制能を有し、半減期が短時間であるこ

とから、正常状態ではほとんど検出されず、癌細胞では、半減期の延長した癌抑制能を持たない変異 p53 が検出されていることが明らかとなった。診断学における、基礎研究の重要性が強く示唆された事例である。本研究で対象とした癌抑制遺伝子であるサイクリンキナーゼインヒビター-p21 については、DNA 損傷の後、p53 が細胞内で発現増強すると、p21

mRNA発現が誘導され、合成されたp21蛋白が、細胞周期進行を抑制する現象が証明されていた。

一方で、細胞周期進行制御を行なう蛋白因子の多くは、蛋白レベルの発現制御が報告されてきた。すなわち、細胞にとって不要になった蛋白は、ユビキチン-プロテアソーム蛋白分解機構により、適切に排除されている現象である。

我々の研究室では、DNA 損傷後に p21 の関わる応答について、図 1 に示す現象を報告した。 p21 は DNA 損傷後に p53 経路によって転写活性化されると同時に、p21 本体もリン酸化などの修飾により安定化する。 DNA 損傷が存在せず、p21 が必要とされない状態では、ユビキチンが結合して、プロテアソームで分解される。 DNA 損傷後、p21 はその分子内の異なる領域を介して種々のサイクリン・CDK と結合して抑制する。 p21 は、その細胞内局在や、C 末端側の短縮により、アポトーシスに対し促進または抑制の全く相反する効果を示す。



同時期に他の研究室からも、p21 の蛋白レベルでの発現制御に関する報告がなされ、p21 のユビキチン-プロテアソーム蛋白分解機構による発現制御機構の解析が p21 による DNA 損傷応答の理解に必須であると考えられた。

2. 研究の目的

p21 は、細胞内に安定的に一定濃度存在すること、そのリン酸化による修飾、蛋白分解酵素による切断、そして細胞内局在部位により多様な機能を果たす能力を有すると考えられる。このような p21 が腫瘍細胞において、どの状態で存在しているかを判定することは、悪性腫瘍の予後診断に極めて重要な情報となる。

分解制御についてこれまでに明らかとなったことには、以下の(1)-(6)があり、つけたものが、我々の研究室で報告したものである。

- (1) p21 にはユビキチンが結合しプロテアソームで分解される。
- (2) p21 はユビキチンが結合しなくてもプロテアソームで分解される。
- (3) p21 の C 末端領域が直接プロテアソームと結合する。
- (4) p21 は DNA 損傷後安定化する。安定化は PI3 kinase inhibitor で抑制される。すなわち安定化にはリン酸化が関る。
- (5) p21 のユビキチン結合には p21 分子内の C 末端領域がシグナルとなっている。
- (6) p21 の C 末端領域に PCNA が結合すると p21 が安定化する。PCNA 結合制御には C 末端のリン酸化が関わっている。

本研究では、p21 の機能および分解制御機構を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

p21 の機能および発現制御機構を解明し、癌組織で、p21 の発現が認められた際の診断的意義を明らかにすることを目的とした実験を行う。

- (1) p21 発現によるアポトーシス制御
種々の mutant p21 を、真核細胞発現ベク

ター pcDNA3.1 His (N 末端 tag)および pcDNA3.1 MycHis (C 末端 tag)に挿入したものを構築する。すでに作成済みのものもある。

作成した p21 発現プラスミドを大腸癌細胞 DLD-1 にエレクトロポレーションで遺伝子導入する。一過性発現実験では、遺伝子導入後 48-72 時間後に細胞を溶解し、蛋白抽出した。恒常発現細胞は、選択マーカーである G418 含有培地で生育した細胞をクローン化し、p21 を発現している細胞を選択し、以下の実験に供した。

ガンマ線照射後の恒常発現細胞におけるアポトーシス表現型を検討した。

(2) 安定発現に関わる分子構造

遺伝子導入の後、細胞上清から、His tag 発現蛋白を Ni アフィニティカラムで精製し、発現の程度、安定性、結合蛋白をウエスタンブロット解析した。

発現後の mutant p21 の発現量は安定性を反映することになる。発現後、ガンマ線照射後の p21 蛋白量の定量により、DNA 損傷と p21 安定化に必要な p21 領域が判明する。

p21 蛋白に結合する細胞蛋白には、Cyclin D,E,A, CDK4 および 2, CDC2, PCNA, Caspase3, Caspase8 が明らかとなっており、それら分子との結合解析を行った。

(3) WISp39 との相互作用

p21 の安定化機構の一つとして、p21 と WISp39 と HSP90 が相互作用する現象が報告された (Jasurcic T et al. Mol Cell. 2005. 17:237-49.)。そこで、これまでに作成した p21 mutant を使用して、対数増殖時と DNA 損傷時におけるこれら 3 つの蛋白の相互作用と、p21 の安定性を解析した。

p21 と WISp39 の真核細胞での発現プラスミドを同時にヒト細胞に導入し、p21 の安定性を評価した。

種々の p21 deletion mutant を恒常発現する細胞を作成し、WISp39 発現プラスミドを導入し安定性を評価した。

WISp39 を恒常発現する細胞を作成し、p21 deletion mutant 発現プラスミドを導入し安定性を評価した。

大腸菌で His-tag WISp39 蛋白を大量に合成し、p21 はヒト細胞で合成したものを使用した、in vitro 結合実験を行った。

4. 研究成果

(1) p21 発現によるアポトーシス制御

p21 は全長 164 アミノ酸から構成され、C 末に核局在シグナルが存在し、C 末の 145Thr, 146Ser がリン酸化されると細胞質に局在する。そこで、145Thr と 146Ser の Ala (非リン酸化体) である T145A, S146A、あるいは Asp (擬リン酸化体) 変異体である T145D, S146D を作成し、それらをヒト大腸癌細胞株に発現させ、細胞内局在と放射線照射後のアポトーシス実行経路に及ぼす影響を観察した。T145A, S146A は核局在の発現であったが、T145D, S146D は核と細胞質両方に発現が認められた。10Gy のガンマ線照射後には、4 種の変異体とも CyclinA と Cdk2 との結合が増加しており、サイクリンキナーゼインヒビターとして機能していた。また、アポトーシス実行の主要酵素である caspase3 活性を測定したところ、4 種の変異体とも変異体を持たない細胞と同様の活性であった。しかし、アポトーシスの表現型の FACS 上 DNA ヒストグラムでの pre-G1 ピークの出現は、T145D 発現細胞で遅延した。この結果は、細胞質に局在する p21 が caspase3 と、あるいはその下流エフェクターと相互作用して、放射線照射によ

るアポトーシス実行を抑制したと考えられた。

(2) 安定発現に関わる分子構造

p21 の安定発現に必須の分子内領域を同定する目的で、図 2A のごとく、N 末端から 20 アミノ酸ごとく欠失させた mutant を作成した。

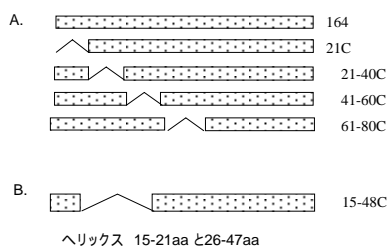


図2 p21 deletion mutantの構造

それぞれの発現を検討したところ、21C、 Δ 21-40C、 Δ 41-60C は極めて不安定で、lactacystin の添加で安定化した。 Δ 61-80C は lactacystin の添加の有無に関わらず安定的に発現した。この現象は、N 末端から 60aa の範囲に、安定化に関わる、すなわち合成直後にプロテアソームによる認識分解から逃れる構造を有することを示唆する。

p21 蛋白は、X 線解析によっても特定の立体構造が報告されておらず、コンピューター解析の結果、立体構造を形成する領域は 15-21 aa と 26-47aa 領域にあるとされる。そこで、図 2B に示す、全長 164aa の N 末側のアミノ酸番号 15 から 48 を欠損した mutant Δ 15-48C を作成して安定性の解析を行った。

Δ 15-48C は極めて不安定であり、 Δ 15-48C はプロテアソームインヒビター lactacystin を加えると安定化した。すなわち 5-48 を含む構造が p21 のプロテアソームによる分解への抵抗性に必須と考えられた。そこで、N 末領域の p21 安定化機構の解析を行なった。

N 末領域が Δ 15-48C を trans に安定化する

かどうかを確認する目的で、図 3A に示す p21N 末端 1-60 または $(1-60) \times 2$ 、 $(1-60) \times 3$ を発現する細胞を作成し、 Δ 15-48C を発現させたが安定化しなかった。

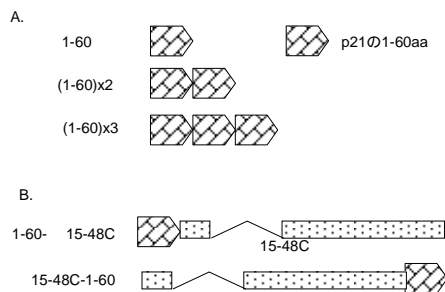


図3 p21 1-60aaの効果解析のためのconstruct

次に N 末領域の cis の作用を解析する目的で図 3B に示す 15-48C の N 末あるいは C 末に 1-60 を付加した mutant を作成して発現させたところ、lactacystin の有無に関らず安定であった。この結果は、分子内に 1-60 領域が存在すればプロテアソーム抵抗性となることを示唆した。

Δ 15-48C の恒常発現細胞を作成し、その発現と機能を解析した。 Δ 15-48C は lactacystin で安定化した。また、6Gy のガンマ線照射後に、mRNA 量は変化せずに蛋白発現が増加し、CyclinA、Cdk2 との結合も増加した。

以上の結果は、p21 安定化には 2 段階の機構が存在することを示唆する。DNA 損傷のない安定的な増殖時における基礎レベルの p21 発現には 15-48 領域が必須である。また、DNA 損傷時には、修飾や他分子との結合など別の機構により蛋白レベルの安定化が起きている機序が推測された。

(3) WISp39 との相互作用

p21 と HSP90 のアダプター蛋白の WISp39 の相互作用について、in vitro と、細胞に発現させた中での観察を行った。大腸菌で大量発

現させた WISp39 と、ヒト大腸癌株細胞で一過性に p21 を発現させた細胞上清を混合したところ、p21 と WISp39 の結合が観察された。p21 のアミノ酸番号 15-48 領域を欠失させると WISp39 と結合しなかったことから、WISp39 と HSP90 による p21 の安定化には 15-48 領域が必須であった。細胞内での p21 と WISp39 の結合実験では、WISp39 と p21 の cotransfection、WISp39 恒常発現細胞における WISp39 と endogenous p21、および WISp39 恒常発現細胞への p21 cDNA の transfection により結合の検討を行なった。細胞上清中に結合物は証明されなかった。invitro 実験で検出した結合が、細胞内で確認し得なかった理由として、本抽出条件では結合を維持し得ない、発現導入した WISp39 が細胞内で適切な局在をしなかった、が挙げられる。今後、実験条件を検討し、細胞内での結合を証明する。さらに、WISp39 による p21 の安定化を WISp39 発現細胞で検討したが、顕著な安定化は検出されなかった。p21 発現は、p21-WISp39-HSP90 により安定化するとされているが、DNA 損傷が存在しない環境では、必要以上の p21 は WISp39 によっては安定化しないのかもしれない。また、p21 安定化には PCNA や CDK などの他の結合蛋白も関わっているため、それら因子の関与も検討しなくてはならない。

p21 の基礎レベルの発現制御において、p21 分子の N 末領域の構造が関わっている。p21 の基礎レベルの発現には、シャペロン蛋白やアダプター蛋白などの細胞因子も関与しているため、発現制御解析は、転写、転写後、および翻訳後の解析が必要となる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Arai D, Nomura N, Fukuchi K, Gomi K
Cytoplasmic localization of Cyclin kinase inhibitor p21 delays the progression of apoptosis
Cancer Genomics & Proteomics 3:29-37 2006

Nomura N, Yamaguchi F, Fukuchi K
The N-terminal 15-48 region of cyclin kinase inhibitor p21 is a determinant of basal expression
Cancer Genomics and Proteomics 4:71-80. 2007

[学会発表](計 3 件)

福地邦彦、新井大輔、野村憲弘、鶴澤龍一、高木康、五味邦英
癌抑制遺伝子 p21 による腫瘍細胞の治療応答性判定のための基礎研究:細胞内局在とアポトーシス制御能
第 52 回日本臨床検査医学会総会 福岡 2005,11

福地邦彦、野村憲弘、西野信一、鶴澤龍一、細谷純一郎、五味邦英
癌抑制遺伝子 p21 による腫瘍細胞の治療応答性判定のための基礎研究:発現の安定性を制御する分子内領域
第 53 回日本臨床検査医学会総会 弘前 2006,11

福地邦彦、西野信一、陳 戈林、安原努、五味邦英
癌抑制遺伝子 p21 による腫瘍細胞の治療応答性判定のための基礎研究:発現の安定性の制御機構
第 54 回日本臨床検査医学会総会 2007 大阪

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

福地 邦彦 (FUKUCHI KUNIHICO)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号:70181287

(2)研究分担者

五味 邦英 (GOMI KUNIHIDE)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号:60053980

(3)連携研究者