

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18310140
 研究課題名（和文） がん抑制タンパク質 p53 四量体形成変異による不活性化機構の解明と機能修復剤の開発
 研究課題名（英文） Inactivation of Tumor Suppressor Protein p53 by Mutations in the Tetramerization Domain and Stabilizing Methods for the Tetrameric Structure.
 研究代表者
 坂口 和靖（SAKAGUCHI KAZUYASU）
 北海道大学・大学院理学研究院・教授
 研究者番号：00315053

研究成果の概要：

がん抑制遺伝子 p53 の変異は、ヒト悪性腫瘍で最も多く報告されている異常である。ヒト p53 はリン酸化タンパク質であり、そのがん抑制機能の発現のためには四量体の形成が必須である。本研究では、四量体形成ドメイン変異や修飾による p53 機能の不活性化機構と変異の閾値を明らかとした。さらに、p53 四量体ドメインに対する安定化法および機能修復ペプチドの開発を実施した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：構造活性相関、蛋白質、癌、バイオテクノロジー、生体分子

1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子 p53 の変異は、ヒト悪性腫瘍で最も多く認められる異常であり、臨床材料における変異の種類や頻度から生物学的意義まで、広範囲の研究が行われてきている。ゲノムの完全性を維持している p53 はがん遺伝子治療の最も重要なターゲットのひとつとなっており、p53 タンパク質の制御機構を理解することは細胞のがん化防御に関する研究にとって不可欠である。ヒト p53 は 393 アミノ酸残基よりなるリン酸化タンパク質であり、そのがん抑制機能の発現のためには四量体の形成が必須である。

p53 四量体形成ドメインは N 端側から β -ストランド (326-333 位)、ターン (334 位)、 α -ヘリックス (335-356 位) の単量体より成る。2 つの単量体が逆平行 β -シートの形成と α -ヘリックス間の相互作用によって二量化し、この二量体 2 つが 4 ヘリックスバンドルによって会合することで四量体は形成される。ところで、ヒト悪性腫瘍において p53 四量体形成ドメイン 31 アミノ酸残基中 23 残基に合計 41 種ものミスセンス変異が発見されている。これら変異による p53 機能の不活性化機構の解明および酸化ストレス等による修飾の四量体構造に与える影響の解析は、p53 遺

伝子のミスセンス変異や酸化による細胞癌化を理解する上で極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、四量体形成ドメイン変異や修飾による p53 機能の不活性化機構の解明を行い、四量体形成安定化を介した変異体タンパク質の機能修復活性をもつ薬剤の開発を目指す。このために、大きく3つの課題、すなわち、p53 四量体ドメイン変異体の構造・安定性解析、p53 四量体ドメインの安定性における酸化修飾の効果、p53 四量体ドメインに対する安定化法および機能修復ペプチドの開発を実施する。

3. 研究の方法

(1) 四量体形成ドメインペプチドの合成と安定性評価

p53 四量体形成ドメインペプチド (319-358) を Fmoc 固相合成法により化学合成し、多量体構造をゲルろ過、二次構造と四量体構造の熱安定性を CD スペクトルにより解析した。

(2) 生細胞中における p53 転写活性の解析系の構築

各細胞に発現した p53 量をモニターすると同時に、同一細胞中における p53 の転写活性をモニターする実験系を構築するために、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) との融合タンパク質として p53 を発現するための発現プラスミッドと、p21 遺伝子の p53 結合配列を利用した p53 依存的なプロモーターの下流に赤色蛍光タンパク質 (DsRed) をコードする cDNA を導入したレポータープラスミッドを作製した。これら2種類のプラスミッドを p53 欠損細胞 (NCI-H1299) に同時に導入し、各細胞に発現した p53 量を緑色蛍光量から測定すると同時に、細胞中の赤色蛍光量から p53 依存的な転写活性を定量化することで、正常細胞に発現する p53 レベルにおける転写活性を評価した。

EGFP-p53 の単量体と四量体の存在比は、EGFP-p53 を発現した細胞から、低イオン強度溶液を用いた細胞抽出液を調製し、オリンパス MF-20 を用いて蛍光強度分布解析 (FIDA) を行い算出した。

(3) 大腸菌におけるペプチド発現量の定量化

p53 四量体形成ドメインペプチドの配列を pET ベクターに組み込み、発現用のベクターを作成した。大腸菌 BL21(DE3)LysS に発現ベクターを導入し、IPTG によりペプチドの発現を誘導した。発現誘導した大腸菌を SDS-PAGE、CBB 染色し、ペプチドのバンド

強度から発現量を定量化した。

(4) 安定化ペプチドのスクリーニング

ELISA プレートおよびアビジンビーズを用いて p53 四量体結合ペプチドを Phage Library から3回のスクリーニングにより同定した。Phage の抽出には大量の p53 ペプチドを用いる方法および 50°C でのインキュベーションにより p53 四量体を変性させる2種の方法を用いた。

4. 研究成果

(1) 腫瘍由来の変異を持つ p53 四量体形成ドメインの構造安定性解析

腫瘍由来の変異を持つ四量体形成ドメイン変異型ペプチドを化学合成し、多量体構造および熱安定性をゲルろ過、CD スペクトルにより解析した。その結果、ほぼ全ての変異型ペプチドが 4°C の低温においては天然様スペクトルを示し、四量体で存在することが判明した。しかし、Pro 変異体、疎水性コア中心に位置する残基の変異体はランダム構造の単量体で存在した。また、興味深いことにターン部位に位置する残基の変異体 G334V、G334W は時間経過あるいは熱により不可逆的に β 構造優位の構造へと変化した。

天然様四量体を形成しうる変異体の熱安定性を求めた結果、変異が構造に及ぼす効果は多岐に渡り、T_m が極めて低い変異体から天然型とほぼ同程度の安定性を示す変異体まで存在することが明らかとなった (図1)。四量体構造を著しく低下させる変異が主に疎水性コアに位置する残基の変異であり、四量体構造の安定性に疎水性コアが極めて重要であることが示された。一方、側鎖が溶媒に露出している残基の変異の効果は、大きくなかった。

興味深いことに、各変異体は天然型と同程度安定性を示す変異体から非常に不安定な変異体まで連続的に分布しており、特定の温度におけるギャップは存在しなかった。このことから、p53 四量体構造の不安定化による p53 機能不全における安定性の閾値は非常に低い可能性が示唆された。

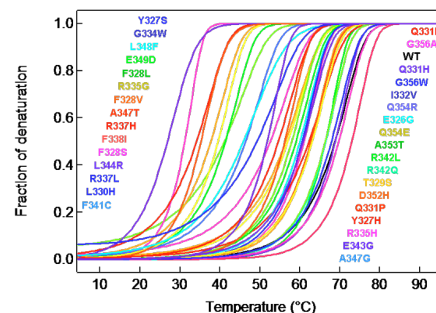


図1 変異型ペプチドの熱安定性

(2) 生細胞中における p53 四量体構造の安定性と転写活性との相関

悪性腫瘍で報告されている四量体形成ドメインにミスセンス点変異を持つ p53 変異体をコードする cDNA を、EGFP-p53 発現プラスミッドに組み込み、それら変異体の転写活性を構築した転写活性解析系で定量化した。p53 変異体の転写活性は、DsRed を発現細胞の割合の減少として定量化した。また、これら変異体の四量体構造の不安定化を FIDA によって定量化した。

その結果、これら変異体 p53 の転写活性低下と四量体構造の不安定化との間には強い相関（相関係数-0.82）が認められ、p53 機能における四量体構造の安定性の重要性が明らかに示された（図2）。

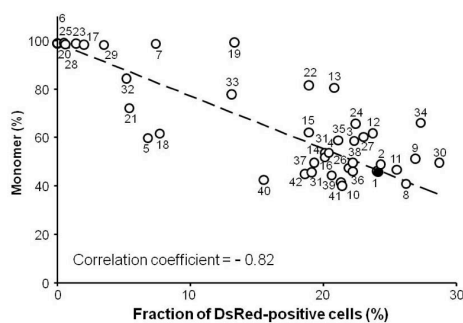


図2 変異体の安定性と転写活性の相関

(3) 大腸菌発現系におけるペプチド発現量と多量体構造安定性の相関

大腸菌タンパク質発現系は得られるタンパク質量が多く、迅速簡便であることから非常に有用な手法である。しかし、タンパク質によっては発現効率の悪いもの、まったく発現が見られないものが存在する。

大腸菌におけるタンパク質発現量にタンパク質の安定性が及ぼす影響を明らかにするため、p53 四量体形成ドメインペプチドの発現量と四量体構造の安定性との相関を解析した。その結果大腸菌における p53 四量体形成ドメインペプチドの発現量とペプチド多量体構造安定性との間に強い正の相関関係があることが明らかとなった。この結果より、大腸菌でのタンパク質発現量が目的タンパク質の構造安定性に影響を受けることが示唆された。

(4) Met 酸化による p53 四量体構造の不安定化

p53 タンパク質は、酸化ストレスによって機能不全を引き起こすことが知られている。この酸化による p53 不活性化と四量体構造の安定性との関係を調べるため、酸化型 p53 四量体形成ドメインペプチドを合成し四量体安定性を解析した。

野生型 p53 四量体形成ドメインペプチドの

Met340 が天然状態で過酸化水素によって完全に酸化されうることを明らかとした。さらに、ゲルろ過および円二色性スペクトルを用いた四量体形成能および熱力学的解析の結果、この酸化型 p53 四量体ペプチドは野生型とほぼ同じ立体構造を形成するが、その安定性が野生型に比べ熱変性において T_m 値が 12.7°C も減少することが明らかとなった（図3）。この不安定化の要因として、四量体構造中の隣接する2個の酸化Metにおける新たに付加された酸素原子間の立体障害あるいは双極子モーメントの反発によるものであることが考えられた。

熱安定性から、この Met 酸化修飾された p53 は野生形と比較して人の体温で四量体を1/10程度しか形成できないことが算出された。以上の結果より、Met 残基の酸化による四量体構造の不安定化が、p53 機能不全の原因の一つであることが示唆された。

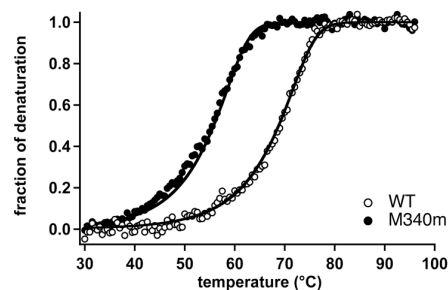


図3 酸化による四量体構造の不安定化

(5) Phage Library による p53 四量体安定化ペプチドの探索

p53 四量体安定化ペプチドを得るため一般的にスクリーニングに用いられる ELISA プレート法と p53 四量体の熱安定性に着目した2種類の方法によりスクリーニングを行い、Phage Library からから6種類の12残基の p53 四量体構造安定化配列を同定した（図4）。

- | | |
|-----------------|-----------------|
| 1: HHRATNLDSTAH | 4: LLADTTHHRPWT |
| 2: TIRPSTTMDSPT | 5: SPMPQLSTLLTR |
| 3: FSPLHTSGNRPS | 6: VPAIIRGVLIWL |

図4 スクリーニングより得られたペプチド配列および二種の特徴的な配列

これらの配列を化学合成し、p53 四量体ペプチドとの相互作用解析および安定化能解析を行った。その結果、最大で四量体構造の T_m 値を 5°C 上昇させた。また、この中から2種類の特徴的なより短い配列(HHR、RPS)を見いだした。さらに、単量体および二量体 HHR ペプチドを化学合成し、二種類の変異形 p53 四量体に作用させたと、K351N 変異体に対しては二量体 HHR ペプチドが、一方 L330H 変異体には単量体 HHR ペプチドが四

量体構造の安定化を示した。これは、変異体に応じて単量体と二量体 HHR ペプチドでの相互作用に変化があり、変異による四量体表面構造の小さな変化が単量体および二量体 HHR ペプチドの与える p53 四量体安定化効果に影響を及ぼしたと考えられる。

(6) Phe 残基の置換による p53 四量体構造の安定化

p53 四量体形成ドメイン内の疎水性コアに存在する 3 個の Phe 残基(328,338,341 位)は、様々な生物種間で高度に保存されている。側鎖にフェニル基を有する Phe はタンパク質間およびタンパク質内の相互作用において中心的役割を果たすことが知られている。p53 四量体構造における Phe 残基の特性を解明するため、四量体形成ドメインペプチド(319-358 位)中の 3 個の Phe 残基を、それぞれ(F5)Phe または Cha に置換したアナログを Fmoc 固相法により化学合成し、それらの構造と安定性を解析した。

ゲルろ過および円二色性スペクトル (CD) を用いて構造安定性を解析した結果、極めて興味深いことに 341 位 Phe の Cha 置換体 (Phe341Cha) は、熱安定性の指標である T_m 値が 100°C を超える超安定四量体構造をとることが明らかとなった。また、エンタルピーも大きく増大していた。

さらに詳細な Phe341Cha アナログの安定化機構の解明のために、圧力変性による体積変化解析および X 線結晶構造解析を実施した。その結果、Phe341Cha は、野生型とほぼ同じ四量体構造を形成するが、野生型で見られた 341 位付近の空隙は、より疎水性で嵩高い Cha 側鎖によって充填されて、著しく小さくなっていることが判明した。これは圧力変性解析により示唆された四量体構造内部の疎水性コアに存在する空隙の充填による四量体構造の安定化機構と一致した。

以上の結果は、立体構造中に存在する空隙の充填がタンパク質の安定化に極めて有効であり、この機構が p53 のみならず種々のタンパク質の安定化におけるデザインにも応用可能であることを示した。

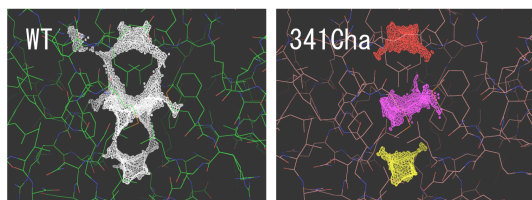


図 5 野生型と Phe341Cha の空隙の比較

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Oxidation of methionine residue at hydrophobic core destabilizes p53 tetrameric structure. T. Nomura, R. Kamada, I. Ito, Y. Chuman, Y. Shimohigashi, and K. Sakaguchi *Biopolymers*, **91(1)**, 78-84 (2009). 査読有
2. Effects of tumor-associated mutations in the p53 tetramerization domain on oligomerization state and transcriptional activity. R. Kamada, T. Terai, T. Nomura, Y. Chuman, T. Imagawa, K. Sakaguchi *Adv. Exp. Med. Biol.*, **611**, 567-568 (2009). 査読有
3. Thermal Stability of p53 Tetramerization Domain Peptides Derived from Various Species. T. Nomura, R. Kamada, Y. Chuman and K. Sakaguchi *Peptide Sci.*, **2008**, 35-36 (2009). 査読有
4. Evaluation of Transcriptional Activity of p53 in Individual Living Mammalian Cell. T. Imagawa, T. Terai, Y. Yamada, R. Kamada, and K. Sakaguchi *Anal. Biochem.* **387**, 249-256 (2009) 査読有
5. Differential Recognition of Phosphorylated Transactivation Domains of p53 by Different p300 Domains. S. Polley, S. Guha, N.S. Roy, S. Kar, K. Sakaguchi, Y. Chuman, V. Swaminathan, and S. Roy, *J. Mol. Biol.*, **376**, 8-12 (2008). 査読有
6. Correlation of Oligomeric Structure and Transcriptional Activity of p53 Mutants. R. Kamada, T. Terai, T. Nomura, Y. Chuman, T. Imagawa, and K. Sakaguchi *Peptide Sci.*, **2007**, 69-70 (2008). 査読有
7. Screening of Peptides to Stabilize the p53 Tetramer Formation from Phage Displayed Library. T. Nomura, R. Kamada, Y. Chuman, and K. Sakaguchi *Peptide Sci.*, **2007**, 315-316 (2008). 査読有
8. Correlation between Expression Level in E. coli and Stability of Oligomeric Structure of the p53 Tetramerization Domain. H. Miyazaki, R. Kamada, T. Nomura, Y. Chuman, T. Imagawa, and K. Sakaguchi *Peptide Sci.*, **2007**, 317-318 (2008). 査読有
9. Structural Photomodulation of Peptides with Azobenzoate Derivative in Peptide Backbone. R. Kamada, K. Fukuda, H. Miyazaki, T.

- Nomura, Y. Chuman, T. Imagawa, K. Tanino, and K. Sakaguchi *Peptide Sci.*, **2007**, 447-448 (2008). 査読有
10. Stabilization of p53 Tetrameric Structure by Polyol Compounds. T. Nomura, Y. Chuman and K. Sakaguchi *Peptide Sci.*, **2006**, 131-132 (2007). 査読有
 11. Thermodynamic Stability of Mutant p53 Tetramerization Domain Peptides Associated with Human Tumors. R. Kamada, T. Nomura, Y. Chuman, T. Imagawa and K. Sakaguchi *Peptide Sci.*, **2006**, 131-132 (2007). 査読有
 12. Unfolding, Aggregation, and Amyloid Formation by the Tetramerization Domain from Mutant p53 Associated with Lung Cancer. Y. Higashimoto, Y. Asanomi, S. Takakusagi, M.S. Lewis, K. Uosaki, S.R. Durell, C.W. Anderson, E. Appella, and K. Sakaguchi *Biochemistry*, **45**, 1608-1619 (2006). 査読有
 13. Analysis of Stabilization by Substitution of Cyclohexylalanine for Phe341 in Hydrophobic Core of p53 Tetramer. T. Nomura, K. Sakamoto, Y. Kasai, Y. Chuman, K. Ishimori and K. Sakaguchi *Peptide Science*, **2005**, 399-402 (2006) 査読有
 14. Fibrillar and Granular Aggregation of G334V Mutant p53 Tetramer Peptide. Y. Asanomi, Y. Higashimoto, Y. Chuman, S. Kaya, T. Imagawa and K. Sakaguchi *Peptide Sci.*, **2005**, 397-398 (2006) 査読有
- [学会発表] (計 26 件)
1. T. Nomura, et al., Thermal stability of p53 tetramerization domain peptides derived from various species. 第 45 回ペプチド討論会, 2008/10/29, 船堀
 2. K. Sakaguchi, Chemical and Structural Proteomics: The Solution to Biological Problems. MPSA2008, 2008/8/26, Sapporo.
 3. H. Miyazaki, et al., Effect of thermodynamic stability on expression level of p53 tetramerization domain peptides in E.coli. MPSA2008, 2008/8/26, Sapporo.
 4. T. Nomura, et al., Analysis of stability for p53 tetramerization domain peptides derived from various species. MPSA2008, 2008/8/26, Sapporo.
 5. K. Sakaguchi, Tetramerization of tumor suppressor protein p53. 12th Akabori Conference: German-Japanese Symposium on Peptide Science, 2008/5/16, Kyoto.
 6. K. Sakaguchi, Tetramerization Domain of Tumor Suppressor Protein p53, Taiwan-Japan International Symposium on Organic Chemistry and Molecular Science, 2008/4/18, Taipei, Taiwan.
 7. 野村尚生 他, 癌抑制タンパク質 p53 四量体形成ドメインペプチドの空隙充填による自己組織可能への影響, 分子情報生命科学シンポジウム 2008, 2008/2/29, 札幌.
 8. 中馬吉郎 他, ターン部位にアゾベンゼンアミノ酸誘導体を導入したペプチドの光による構造制御, 分子情報生命科学シンポジウム 2008, 2008/2/29, 札幌.
 9. 宮崎広充 他, 大腸菌発現量におけるペプチド構造安定性の効果, 北海道支部 2008 年冬季研究発表会, 2008/1/29, 札幌.
 10. T. Imagawa, et al., Stability of oligomeric structure is the key factor for transcriptional activity in tumor suppressor protein p53 BMB2007 : 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 2007/12/11, 横浜.
 11. 坂口和靖 他, Correlation of oligomeric Structure and Transcriptional Activity of p53 Mutants, 第 44 回ペプチド討論会, 2007/11/7, 富山.
 12. R. Kamada, et al., Structural photomodulation of peptides with azobenzoate derivative in peptide backbone, 第 44 回ペプチド討論会, 2007/11/7, 富山.
 13. H. Miyazaki, et al., Correlation between expression level in E.coli and stability of oligomeric structure of the p53 tetramerization domain, 第 44 回ペプチド討論会, 2007/11/7, 富山
 14. T. Nomura, et al., Screening of peptides to stabilize the p53 tetramer formation from phage displayed library formation from phage displayed library, 第 44 回ペプチド討論会, 2007/11/7, 富山.
 15. 坂口和靖, 癌抑制タンパク質 p53 四量体形成ドメイン, 日本バイオインフォマティ

- クス学会北海道地域部会, 2007.8.3, 札幌.
16. R. Kamada, et al., Effects of Tumor-Associated Mutations in the p53 Tetramerization Domain on Oligomerization State and Transcriptional Activity, 20th American Peptide Society Symposium, 2007/6/26, Montréal, Quebec, Canada.
 17. 鎌田瑠泉 他, ヒト悪性腫瘍で見られる変異が癌抑制タンパク質 p53 四量体構造の安定性に与える影響, 日本化学会第 87 春季年会, 2007/3/25, 大阪.
 18. R. Kamada, et al., Oligomeric Structures and Stability of Mutant p53 Tetramerization Domain Peptides Associated with Human Tumors. Japan - China Joint Symposium on Modern Chemistry 2nd Hokkaido University-Nanjing University joint Symposium, 2006/11/10, Sapporo.
 19. T. Nomura, et al., Polyol Osmolytes Affect Stability and Oligomeric State of p53 Tetramerization Domain. Japan - China Joint Symposium on Modern Chemistry 2nd Hokkaido University- Nanjing University joint Symposium, 2006/11/10, Sapporo.
 20. T. Nomura, et al., Stabilization of p53 Tetrameric Structure by Polyol Compounds, 第 43 回ペプチド討論会, 2006/11/5, 横浜.
 21. R. Kamada, et al., Thermodynamic stability of mutant p53 tetramerization domain peptides associated with human tumors. 第 43 回ペプチド討論会, 2006/11/5, 横浜.
 22. T. Nomura, et al., Stabilization of p53 Tetramerization Domain by Occupying Cavities with Cyclohexylalanine, The 20th symposium of the protein society, 2006/8/5, San Diego, California, USA.
 23. Y. Asanomi, et al., Amyloid formation of mutant p53 peptide was affected by hetero-oligomerization with the wild-type peptide. The 20th symposium of the protein society, 2006/8/5, San Diego, California, USA.
 24. R. Kamada, et al., Effects of Mutation in p53 tetramerization domain on oligomeric structure and stability. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006/6/18, Kyoto.
 25. T. Nomura, et al., Stabilization by substitution of cyclohexylalanine for phe341 in hydrophobic core of p53 tetramer. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006/6/18, Kyoto.
 26. T. Terai, et al., Correlation Between Stability of Oligomeric Structure and Transcriptional Activity in Tumor Suppressor Protein p53 Mutants. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006/6/18, Kyoto.
- [産業財産権]
○出願状況 (計 2 件)
1. 名称:「プロテインホスファターゼ阻害剤」
発明者: 坂口和靖、谷野圭持、中馬吉郎、吉村文彦、八木寛陽
番号: 特願 2008-262646
出願年月日: 2008 年 10 月 9 日
国内外の別: 国内
 2. 名称: p53 翻訳後修飾部位を特異的に認識するモノクローナル抗体、及びその抗体を含む修飾部位測定キット
発明者: 坂口和靖、中馬吉郎、明日山康生、松木園美穂
番号: PCT/JP2006/306921、特願 2007-511193
出願年月日: 2006 年 3 月 31 日
国内外の別: 国内および国外
- [その他]
ホームページ
<http://barato.sci.hokudai.ac.jp/~biochem/index.html>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
坂口 和靖 (SAKAGUCHI KAZUYASU)
北海道大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号: 00315053
- (2) 研究分担者
今川 敏明 (TOSHIAKI IMAGAWA)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院
・准教授
研究者番号: 20142177
- 中馬 吉郎 (CHUMAN YOSHIRO)
北海道大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号: 40372263
- (3) 連携研究者
なし