

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06521

研究課題名(和文) がん抑制因子p53凝集の構造動態と機能の解明

研究課題名(英文) Structural dynamics of tumor suppressor protein, p53, in its aggregation process

研究代表者

中山 隆宏 (Takahiro, Nakayama)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・准教授

研究者番号：00532821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制因子p53は、がんで最も多く変異が見つかるタンパクで、変異型の発現がドミナントネガティブ効果で野生型のがん抑制機能の喪失を誘導することが定説となっている。しかし、p53には天然変性領域が含まれており、従来の構造解析では全長の立体構造を明らかにできないため、このドミナントネガティブ効果の分子メカニズムは不明である。そこで本研究では、アミロイドタンパクなどの天然変性タンパクの構造動態を可視化できる高速原子間力顕微鏡を用いて、p53を観察した。その結果、p53のコアドメイン(DNA結合ドメイン)が生理条件下ではアミロイド線維の前駆体とされるプロトフィブリル様の構造を形成することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、p53が凝集してアミロイド特有のクロス構造を持ち得ることを示した。さらに、液中生理条件下における試料の3次元構造がアミロイド線維というよりもむしろアミロイド線維前駆体であるプロトフィブリルに似た構造であることを発見した。近年、神経変性疾患の分野では、アミロイド線維よりもオリゴマーやプロトフィブリルの方が毒性が高いことが定説になりつつある。今後、細胞・組織レベルにおけるp53プロトフィブリル様凝集体の機能解析を進めることで、本研究成果は、p53変異による腫瘍発生メカニズムに新たなコンセプトを提供し得る。

研究成果の概要(英文)：The tumor suppressor protein, p53, is the protein most frequently found mutated in cancer, and it is well established that expression of the mutant form induces loss of tumor-suppressing function of the wild type by a dominant-negative effect. However, the molecular mechanism of this dominant-negative effect is unknown because p53 contains intrinsically disordered regions and its full-length structure cannot be determined by conventional structural analysis. In this study, we observed p53 using high-speed atomic force microscopy, which can visualize the structural dynamics of intrinsically disordered proteins including amyloidogenic proteins. As a result, we found that the core domain (DNA binding domain) of p53 forms a protofibril-like structure under physiological conditions, which is defined as the precursors of amyloid fibrils.

研究分野：生物物理化学

キーワード：がん抑制因子 タンパク凝集 一分子観察

1. 研究開始当初の背景

がん抑制因子 p53 をコードする遺伝子 TP53 は、がんの症例のおよそ半分と最も多く変異が見つかる遺伝子である。発がんストレス下において、p53 は転写調節因子として下流の遺伝子発現を調節し、細胞周期の停止や細胞死を誘導し、細胞のがん化を抑制する。p53 はホモ四量体として DNA に結合して機能する。変異型 p53 の発現はドミナントネガティブ作用によって、野生型 p53 のがん抑制機能を低下させることが広く受け入れられている¹。一方で、変異型 p53 が野生型 p53 の機能を喪失させる分子メカニズムは、議論が残っている。その議論の中には、変異型 p53 が凝集し、野生型 p53 を共凝集させる²、また、プリオンタンパクのように、p53 がアミロイド線維を形成して野生型 p53 も凝集させ、さらにその線維が別の細胞に伝播して、がん化を促進するという説もある³。これら p53 の構造変化を伴う分子プロセスの解明には、p53 の構造とそのダイナミクスを明らかにする必要がある。しかしながら、p53 は一定の構造をとらない天然変性領域を含むため、X 線結晶構造解析、核磁気共鳴、クライオ電子顕微鏡の構造解析では立体構造は明らかにできず、このことが p53 機能喪失の分子メカニズム解明を妨げている。

他方、本研究代表者らは、天然変性領域を持つアミロイドタンパクの凝集過程の構造動態を高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を用いて 1 凝集体分子レベルで可視化して解析してきた。高速 AFM は、現状、天然変性領域を可視化できる唯一の手法で、天然変性領域を含むタンパクの構造動態の解析の強力なツールとなっている。これまでに本研究代表者らは、アルツハイマー病原因タンパク・アミロイド β⁴⁵、パーキンソン病原原因タンパク・αシヌクレイン⁶、プリオンモデルタンパク酵母 Sup37⁷、2 型糖尿病タンパク・アミリンの凝集^{8,9}の構造動態を解析している。そこで、p53 凝集の構造動態を高速 AFM で可視化する本研究を立案した。

2. 研究の目的

がん抑制因子 p53 の凝集を一分子レベルで高速 AFM を用いて可視化し、p53 機能喪失における p53 凝集の分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

●ヒト p53 コアの大腸菌組換えタンパクの調製

大腸菌組換えタンパクとしてヒト p53 の DNA 結合ドメインを含むコアドメイン (94-312 番目のアミノ酸) の野生型と、頻度の高い変異 (hot spot 変異) のうち、構造変化を伴う Structure mutant の R175H, R248Q、構造変化を伴わないが DNA 結合が阻害される Contact mutant の R273H の計 3 種類を調製した。

●凝集反応

調製したタンパクを 37°C (静置) でインキュベートして凝集反応を開始した。

●p53 コアの凝集のキネティック解析

アミロイド線維特有の構造であるクロス β 構造に結合して蛍光強度が増大する蛍光色素・チオフラビン T を凝集反応液に加えて凝集反応させ、チオフラビン T の蛍光強度のタイムコースを測定した。

●p53 凝集の構造動態解析

調製した p53 コアの単量体、凝集反応後の凝集体をマイカに置き、液中で高速 AFM 観察した。凝集体をマイカに置いた後、試料チャンバー内に単量体を導入して凝集体が成長するか高速 AFM を用いて観察した。

4. 研究成果

●p53 コアの凝集のキネティック解析

p53 コアドメインの野生型、R175H, R248Q, R278Q の各変異型の水溶液に少量のチオフラビン T を加えて 37°C でインキュベートし、チオフラビン T の蛍光強度の経時変化を測定したところ、図 1 に示すタイムコースが得られた。いずれの p53 コアドメインも、インキュベート直後に蛍光強度が上がりにくい期間 (ラグ期間) があり、その後速やかに上昇して一定の飽和値に漸近するシグモイド曲線を描いた。Structure mutant の R175H はラグタイムが短く、最も速やかに飽和値に漸近した。一方で同じく Structure mutant の R248H は野生型と似た凝集キネティクスを示した。Contact mutant の R273H は、野生型よりも増大速度が高く、飽和値は 4 者の中で最も高かった。アミロイド β などのアミロイドタンパクも単量体からの凝集のチオフラビン T 蛍光強度タイム

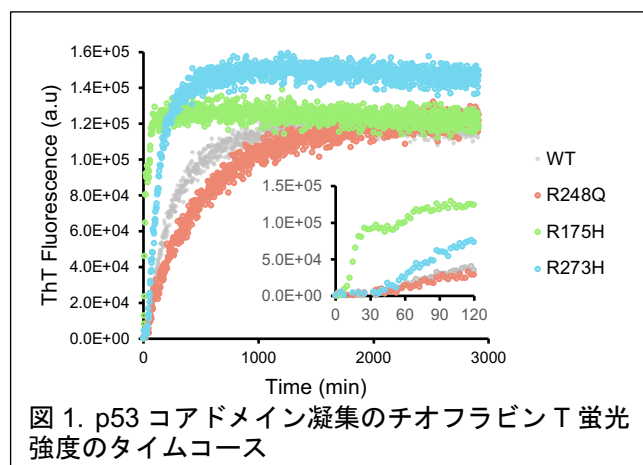


図 1. p53 コアドメイン凝集のチオフラビン T 蛍光強度のタイムコース

コースを測定したところ、図 1 に示すタイムコースが得られた。いずれの p53 コアドメインも、インキュベート直後に蛍光強度が上がりにくい期間 (ラグ期間) があり、その後速やかに上昇して一定の飽和値に漸近するシグモイド曲線を描いた。Structure mutant の R175H はラグタイムが短く、最も速やかに飽和値に漸近した。一方で同じく Structure mutant の R248H は野生型と似た凝集キネティクスを示した。Contact mutant の R273H は、野生型よりも増大速度が高く、飽和値は 4 者の中で最も高かった。アミロイド β などのアミロイドタンパクも単量体からの凝集のチオフラビン T 蛍光強度タイム

コースはシグモイド曲線であることから、これらの結果は、p53 コアドメインが時間経過とともにクロスβ構造を形成し得ること、アミロイド凝集様であることを示した。また、ラグ期間の長さ、増大期における増大速度、飽和値は Structure mutant と Contact mutant で共通の傾向があるというよりもむしろ点変異の種類によって多様であることを示した。

●p53 コアドメイン単量体の構造動態解析

p53 コアドメインの野生型、R248Q、R278Q の各変異型の単量体をマイカステージに置いて高速 AFM で観察した。いずれの p53 コアドメイン単量体も球状構造を示した (図 2)。コアドメインのほとんどを占める p53DNA 結合ドメインは原子分解能の構造解析がなされている。この構造データから作成したシミュレーション AFM 像¹⁰も同様に球状構造を示し、両者の形状は一致した (図 2)。他方、粒子のサイズはシミュレーション AFM 像の方が大きく見積もられた。高速 AFM 観察における p53 コアドメインのサイズは走査時のタッピング力が大きいほど小さく見積もられたため、シミュレーション AFM 像と高速 AFM 像におけるサイズの違いは、観察条件の違いに由来すると考えられる。

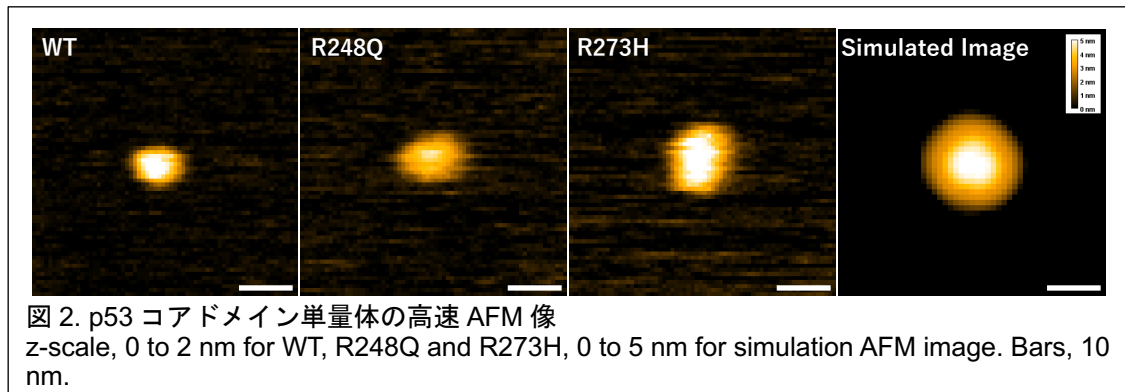


図 2. p53 コアドメイン単量体の高速 AFM 像
z-scale, 0 to 2 nm for WT, R248Q and R273H, 0 to 5 nm for simulation AFM image. Bars, 10 nm.

●p53 コアドメイン凝集の構造動態解析

チオフラビン T を用いた凝集反応分析において飽和値に達した段階における p53 コアドメイン凝集体がアミロイド線維様の構造であるか検討するため、液中で高速 AFM 観察した。図 3 に示すように、野生型、変異型ともに球状の凝集体や折れ曲がった構造を示した。アミロイド線維は一般的に線維軸が真っ直ぐで枝分かれができないことから、これらの構造はアミロイド線維様とは異なる構造と考えられる。他方、アミロイドタンパクはアミロイド線維構造だけでなく、球状オリゴマーや折れ曲がった凝集体 (プロトフィブリル) などを形成し、プロトフィブリルもチオフラビン T の蛍光強度を増大させることが知られている^{5,11}。特に R248Q の凝集体 (図 3) はアミロイドβのプロトフィブリルと形状が似ていた。

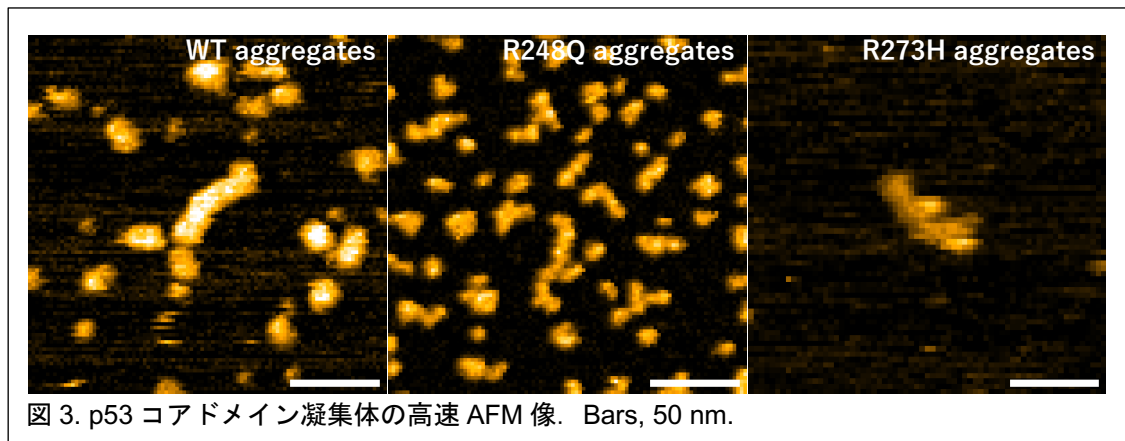


図 3. p53 コアドメイン凝集体の高速 AFM 像. Bars, 50 nm.

次に、凝集体が成長する過程の高速 AFM 観察を行った。凝集体をマイカ表面に置いて観察後、試料チャンバー内に単量体を投入して観察を続けた。図 4 に示すように、球状の凝集体が時間経過とともに折れ曲がったより大きな凝集体を形成する過程を撮影することができた。これらの

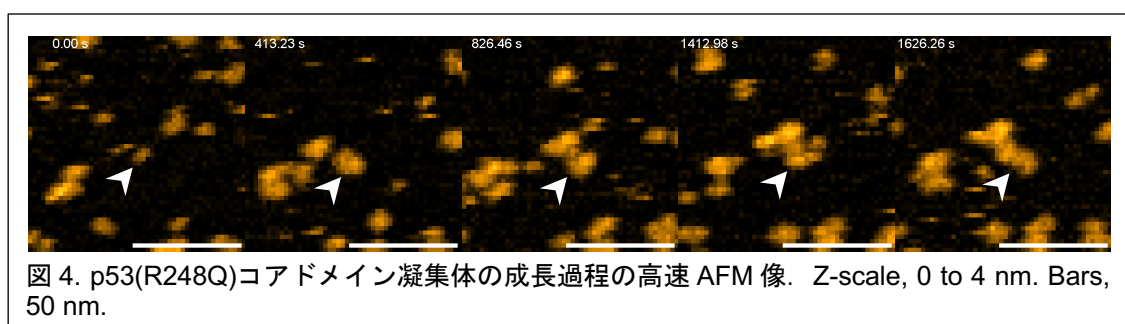


図 4. p53(R248Q)コアドメイン凝集体の成長過程の高速 AFM 像. Z-scale, 0 to 4 nm. Bars, 50 nm.

結果は、分析・観察した条件（生理食塩水程度のイオン強度、中性）において、p53 がアミロイド線維よりもその前段階の球状の凝集体やプロトフィブリル様の構造を優占して形成することを示している。

<引用文献>

1. Bykov, V., Eriksson, S., Bianchi, J. et al. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 18, 89–102 (2018).
2. Xu, J., Reumers, J., Couceiro, J. et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol* 7, 285–295 (2011).
3. Silva, J.L., Cino, E.A., Soares, I.N. et al. Targeting the Prion-like Aggregation of Mutant p53 to Combat Cancer. *Acc Chem Res* 51, 1, 181–190 (2018).
4. Watanabe-Nakayama, T., Ono, K., Itami, M. et al. High-speed atomic force microscopy reveals structural dynamics of amyloid β 1–42 aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(21):5835–40 (2016)
5. Watanabe-Nakayama, T., Tsuji, M., Umeda, K. et al. Structural Dynamics of Amyloid- β Protofibrils and Actions of Anti-Amyloid- β Antibodies as Observed by High-Speed Atomic Force Microscopy. *Nano Lett.* May 4 (2023). Online ahead of print.
6. Watanabe-Nakayama, T., Nawa, M., Konno, H. et al. Self- and Cross-Seeding on α -Synuclein Fibril Growth Kinetics and Structure Observed by High-Speed Atomic Force Microscopy. *ACS Nano* 14(8):9979–9989 (2020).
7. Konno, H., Watanabe-Nakayama, T., Uchihashi, T. et al. Dynamics of oligomer and amyloid fibril formation by yeast prion Sup35 observed by high-speed atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(14):7831–7836 (2020).
8. Sahoo, B.R., Genjo, T., Watanabe-Nakayama, T. et al. A cationic polymethacrylate-copolymer acts as an agonist for β -amyloid and an antagonist for amylin fibrillation. *Chem Sci* 10, 3976–3986 (2019).
9. Sahoo, B.R., Souders, C.L. 2nd, Watanabe-Nakayama, T. et al. Conformational Tuning of Amylin by Charged Styrene-Maleic-Acid Copolymers. *J Mol Biol* 434(2):167385 (2022).
10. Amyot, R., Marchesi, A., Franz, C.M. et al. Simulation atomic force microscopy for atomic reconstruction of biomolecular structures from resolution-limited experimental images. *PLoS Comput Biol* 18(3): e1009970 (2022).
11. Walsh, D. M.; Hartley, D. M.; Kusumoto, Y. et al. Amyloid Beta-Protein Fibrillogenesis. Structure and Biological Activity of Protofibrillar Intermediates. *J Biol Chem* 274 (36), 25945–25952 (1999).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Konno Hiroki*, Watanabe-Nakayama Takahiro*(equally contribution), Uchihashi Takayuki, Okuda Momoko, Zhu Liwen, Kodera Noriyuki, Kikuchi Yousuke, Ando Toshio, Taguchi Hideki	4. 巻 117
2. 論文標題 Dynamics of oligomer and amyloid fibril formation by yeast prion Sup35 observed by high-speed atomic force microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7831 ~ 7836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1916452117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe-Nakayama Takahiro, Sahoo Bikash R., Ramamoorthy Ayyalusamy, Ono Kenjiro	4. 巻 21
2. 論文標題 High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals the Structural Dynamics of the Amyloid- and Amylin Aggregation Pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4287 ~ 4287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21124287	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Watanabe-Nakayama Takahiro, Nawa Maika, Konno Hiroki, Kodera Noriyuki, Ando Toshio, Teplow David B., Ono Kenjiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Self- and Cross-Seeding on -Synuclein Fibril Growth Kinetics and Structure Observed by High-Speed Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 9979 ~ 9989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.0c03074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Watanabe-Nakayama Takahiro, Ono Kenjiro	4. 巻 197
2. 論文標題 Acquisition and processing of high-speed atomic force microscopy videos for single amyloid aggregate observation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods	6. 最初と最後の頁 4 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymeth.2021.06.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe-Nakayama Takahiro, Ono Kenjiro	4. 巻 71
2. 論文標題 Single-molecule observation of self-propagating amyloid fibrils	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 133 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfac011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe-Nakayama Takahiro, Tsuji Mayumi, Umeda Kenichi, Oguchi Tatsunori, Konno Hiroki, Noguchi-Shinohara Moeko, Kiuchi Yuji, Kodera Noriyuki, Teplow David B., Ono Kenjiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Structural Dynamics of Amyloid- Protofibrils and Actions of Anti-Amyloid- Antibodies as Observed by High-Speed Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.nanolett.3c00187	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------