

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501267

研究課題名(和文)p53コドン72SNPによるp53活性化挙動変化の解析

研究課題名(英文)Analysis of p53 72SNP in stress response

研究代表者

土生 敏行(Habu, Toshiyuki)

京都大学・放射線生物研究センター・助教

研究者番号：70346071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子多型SNPは疾患への感受性や外的因子への応答に深く関わっている。その代表例として本研究ではp53 SNPであるR72遺伝子座に着目し実験系の構築を行った。相同組み換え技術を使った遺伝子変換を行い、R72遺伝子座を持つ細胞をP72遺伝子座を持つ細胞に変換することに成功し、このSNPの違いによる外的因子への応答変化を追跡した。これらの実験より、p53 SNPの相違はp53の持つ能力を変化させた結果、細胞の外的因子への応答を大きく変化させることを明らかにしてきた。これらのことからSNP研究に実験系を構築し、比較することでSNPの解析研究を大きく飛躍させることができることを確認できた。

研究成果の概要(英文)：Single nucleotide polymorphism(SNP) affect disease and stress responses. To address the relationship between SNP and stress response, p53 72SNP was introduced in human cell line using genetic recombination method. These cells showed the different responses under DNA damage agents although these cells have same genetic background. These results indicated that p53 SNP affect physiological output and these approach are useful for SNP study.

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：p53 SNP HPV

1. 研究開始当初の背景

p53 遺伝子は癌抑制遺伝子であり、P53 は多くの細胞機能(増殖、細胞周期、DNA 修復、細胞老化、細胞死など)を制御する中心的な転写因子である。申請者が同定し研究を行っている p31comet は p53 と直接結合し、サイクリンインヒビター-p21 等の細胞周期制御関連遺伝子の発現誘導に必須で、DNA 損傷時における p53 依存的な細胞周期停止と細胞死の選択を決定する転写活性化因子として機能することを明らかにしてきた (Habu, T. *et al.* 未発表)。

p53 はストレスの状況に応じその標的遺伝子群の転写活性化の厳密な制御により細胞の運命の決定していることが報告されている。p53 コドン 72 SNP (アルギニン型 (R) とプロリン型 (P)) は古くより多くの研究がなされ、癌化学治療に対する感受性や細胞死の誘導能等で SNP 間に差があること、また p53 転写活性化能に違いがあるなど様々なことが報告されているが統一的な見解はなされていない。(Grochola L.F. *et al.* 2010)

一方パピローマウイルス起因の子宮頸がん発症において p53 はその一番目の標的タンパク質で、パピローマウイルス E6 に対して不安定化することが知られている。またその感受性がコドン 72 SNP の違いにより異なること、さらに子宮頸がん発症頻度とリンクしているということが報告されている (Storey, A. *et al.* *Nature* 1998)。しかし SNP の違いによる p53 の不安定化の差や子宮頸がんにおける発症の差に関しては未だに統一的な見解やそのメカニズムを示す報告はなされていない。

2. 研究の目的

SNP(single nucleotide polymorphism)は疾患への感受性や外的因子への応答に関連すると考えられている。ヒト p53 だけが持つ 72 残基 SNP も同様にパピローマウイルス (HPV) 起因の子宮頸がん発症と関連し、こ

の SNP が p53 標的遺伝子発現誘導能に深く関わっているとされている。

本申請研究では 相同組換えにより人工的に SNP を導入した細胞を確立する。 p53 SNP 差による外的要因への応答変化の解析を行う。 SNP の違いによる HPV に対する p53 応答変化を解析し、発がん及び子宮頸がん発症との関連を再度検証しそのメカニズムの解明に迫りたい。

3. 研究の方法

p53 SNP の差異による転写活性化能の違いに焦点を絞り基礎的研究を完成し、同一の遺伝的背景の R 型及び P 型 p53 の差異と癌抑制機能の相関関係のモデル化を展開するための基礎となる研究を行う。研究期間内に以下のことを行っていく。

ヒト p53 解析に適したヒト癌細胞株での P 型ホモ遺伝子座を持つ細胞株の樹立。

樹立した p53 P 型ホモ遺伝子座を持つ細胞と R 型ホモ遺伝子座を持つ野生型細胞の外的因子 (DNA 損傷ストレス、酸化ストレス、その他薬剤ストレス) による細胞周期制御等の違いを比較検討し癌抑制機能や発がん とコドン 72SNP との関連を解明する。

p53 標的遺伝子群を細胞周期制御、アポトーシス制御に分類し、外的因子による遺伝子発現誘導プロファイルの作成と細胞周期制御等との相関関係を調べ、p53 コドン 72SNP による癌抑制機能や発がんとの関連を明らかにする。

p53 P 型及び R 型細胞でのパピローマウイルス E6 に対する p53 タンパク質の安定性、挙動変化の再現実験、さらに

同様標的遺伝子発現誘導プロファイルを作成し SNP によるパピローマウイルス感染への p53 挙動変化の相関の解析。

p53 コドン 72SNP による挙動変化分子機構を明らかにするため、p53 P 型及び R 型細胞を用い p53 結合因子のプロテオミ

クス解析を行う。これにより p53 P 型、R 型の機能差を明確にしていく。

4. 研究成果

相同組み換え技術を使った遺伝子変換を行い、R72 遺伝子座を持つ細胞を P72 遺伝子座を持つ細胞に変換することに成功し、この SNP の違いによる外的因子への応答変化を追跡した。これらの実験より、p53 SNP の相違は p53 の持つ転写活性化能力を変化させた結果、細胞の外的因子への応答を大きく変化させることを明らかにしてきた。特に p21 cyclin inhibitor の転写誘導能が著しく変化し、一方細胞死を誘導する因子の転写誘導能には関連していないようであった。

一方、HPV16 E6 に対する感受性を検討した結果、R72 は高度に感受性を示すのに対し、P72 遺伝子座では全く感受性を示さなくなっていた。E6 と p53 の結合度合を調べたが、結合そのものには全く関係しておらず、またその補助因子 E6AP タンパク質との結合に関しても安定性の変化には関連性を導くことはできなかった。E6 と p53 SNP による感受性の違いは更なる検討が必要である。

これらのことから SNP 研究に実験系を構築し、比較することで SNP の解析研究を大きく飛躍させることができることを確認できた。

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 5 件)

1. Pcf1, a large subunit of CAF-1, required for maintenance of checkpoint kinase Cds1 activity
Kunoh T and Habu T.
Springer Plus 2014 Jan; 3:30
2. The p31^{comet} inactivates the chemically induced Mad2-dependent spindle assembly checkpoint and leads to

resistance to anti-mitotic drugs

Habu T and Matsumoto T.

Springer Plus 2013 Oct 25; 2:562

3. The moyamoya disease susceptibility variant RNF213 1 R4810K induces genomic instability by mitotic abnormality.
Hitomi T*, Habu T*, Kobayashi H, Okuda H, Harada HK, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 2013 Oct 4; 439(4):419-426
*These authors contributed equally to this work.
4. Downregulation of Securin by the variant RNF213 R4810K (rs112735431, G>A) reduces angiogenic activity of induced pluripotent stem cell-derived vascular endothelial cells from moyamoya patients.
Hitomi T*, Habu T*, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K, Koizumi A.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 2013 Aug 16; 438(1):13-19
*These authors contributed equally to this work.
5. An E2 enzyme Ubc11 is required for ubiquitination of Slp1/Cdc20 and spindle checkpoint silencing in fission yeast.

- Horikoshi Y, Habu T, Matsumoto T.
Cell Cycle 2013 Mar 15; 12(6):961-71
6. A mutation of the fission yeast EB1 overcomes negative regulation by phosphorylation and stabilizes microtubules.
Iimori M, Ozaki K, Chikashige Y, Habu T, Hiraoka Y, Maki T, Hayashi I, Obuse C, Matsumoto T.
Exp. Cell Res. 2012 1;318(3):262-75
7. Genistein, abundant isoflavonoids in soybeans, prevents the formation of excess radiation-induced centrosomes via p21 up-regulation.
Shimada M, Kato A, Habu T and Komatsu K.
Mutat Res. 2011 Nov 1;716(1-2):27-32.
8. Expansion of Intronic GGCCTG Hexanucleotide Repeat in NOP56 Causes a Type of Spinocerebellar Ataxia (SCA36) Accompanied by Motor Neuron Involvement
Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Yang WL, Okuda H, and Koizumi A.
Am. J. Hum. Genet. 2011 89(1):121-30.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 土生敏行
Moyamoya meets mitosis?
生命科学シンポジウム 京都大学しらかん会館
2. 小林果、人見敏明、土生敏行、原田浩二、小泉昭夫
Mysterin 遺伝子の R4810K 多型はもやもや病特異的 iPS 細胞由来血管内皮細胞において Securin の発現抑制を介して血管形成能を低下させる
第 13 回 分子予防環境医学研究会
2014 年 1 月 31-2 月 1 日 和歌山県民

文化会館

3. 人見敏明、小林果、土生敏行、原田浩二、小泉昭夫
もやもや病感受性変異体 Mysterin R4810K は有糸分裂異常によりゲノム不安定性を誘導する
第 13 回 分子予防環境医学研究会
2014 年 1 月 31-2 月 1 日 和歌山県民文化会館
4. 小林果、阿部康二、松浦徹、池田佳生、人見敏明、土生敏行、劉万洋、奥田裕子、原田浩二、小泉昭夫
NOP56 遺伝子イントロンにおける 6 塩基リピート拡張は脊髄小脳変性症 36 型を引き起こす
第 82 回日本衛生学会学術総会、京都大学吉田キャンパス、2012 年 3 月【第 82 回日本衛生学会学術総会最優秀演題受賞】
5. 小林果、阿部康二、松浦徹、池田佳生、人見敏明、明地雄司、土生敏行、劉万洋、奥田裕子、小泉昭夫
ALS 様運動神経障害を伴う新規脊髄小脳変性症(SCA36)の原因遺伝子発見
第 11 回 分子予防環境医学研究会
2012 年 1 月 川崎医科大学
6. Toshiyuki Habu, Tsuyoshi Ikura, Tomohiro Matsumoto
“Stress response controlled by differential binding of p31comet to p53”
The Sugahara memorial international symposium
“Prospective Topics and charm of Radiation Biology” 京都大学 2012 年 1 月
7. 土生 敏行
ストレス誘導型 p53-p31comet 複合体形成

調節機構の解析

第 15 回 日本がん分子標的治療学会 2011

年 6 月 東京

(ポスター発表)

1. 土生 敏行

p53codon72 アリル polymorphism と

p53-p31comet 複合体関連解析

第 16 回 日本がん分子標的治療学会

2012 年 6 月 北九州

2. 土生 敏行

ストレス誘導型 p53-p31comet 複合体形成

調節機構の解析

第 70 回 日本癌学会学術総会 2011 年

10 月 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

土生 敏行 (1)

研究者番号：70346071

(2)研究分担者

無 ()

研究者番号：

(3)連携研究者

無

()

研究者番号：