

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651210

 研究課題名（和文） iPS細胞の樹立効率化のためのヘテロオリゴマーを介した
癌抑制タンパク質 p53 阻害

 研究課題名（英文） Inhibition of tumor suppressor protein p53-dependent transcription
by a tetramerization domain peptide via hetero-oligomerization

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（和文）：

本研究では、改良型 p53 四量体形成ドメインペプチド ES1-p53Tet によって、癌抑制タンパク質 p53 の転写活性および UV 刺激による p53 依存的 p21 発現を顕著に抑制することに成功した。ヘテロ四量体形成を介した本手法は、標的細胞の p53 機能を効率的かつ一過的な阻害に有効であることが示され、様々な組織や臓器の細胞に分化する能力をもつ iPS 細胞の樹立効率向上への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have developed a method for transient inhibition of p53-dependent transcription using a p53 tetramerization domain peptide that contains cell penetrating and nuclear localization signals. The peptide was efficiently introduced into cells and inhibited p21 expression via heterotetramerization with endogenous p53 protein. This method can be applied towards safe and efficient iPS cell generation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：蛋白質、核酸、酵素、生体分子、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は、Oct3/4 などの複数の多能性誘導因子を体細胞に導入し、分化をリセットした細胞であり、胚細胞と同様な分化万能性を有している。そのため、iPS 細胞は新薬の安全性評価、疾患メカニズム解明のためのモデル細胞、さらには拒絶反応のない自身の体細胞由来の再生医療など、医学の分野をはじめとした数多くの応用が期待されている。

しかしながら、現在この樹立効率は極めて低く、実用化へ向けた際の大きな障害となっている。この原因として、多能性誘導因子の導入刺激および誘導因子発現により癌抑制

タンパク質 p53 を中心とした p53-p21 シグナル経路が活性化されることが報告されており、樹立過程における p53 の有効な阻害は、iPS 細胞の作製効率の飛躍的な改善につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、iPS 細胞作製の対象となる細胞において、『内因性 p53 タンパク質とペプチド阻害剤のヘテロ四量体形成を基盤として p53 機能を効率的かつ一過的に阻害する方法論を開発する』ことである。

3. 研究の方法

(1) 四量体形成ドメインペプチドの合成と構

造解析

p53Tet ペプチドは Fmoc 固相法を用いて合成した。ペプチド N 末端の蛍光ラベル化は、Alexa Fluor 350 carboxylic acid succinimidyl ester を用いた。合成した粗ペプチドは、逆相 HPLC で精製し、MALDI-TOF により同定した。p53Tet ペプチドの多量体状態は、ゲル濾過 (Superdex 75 PC3.2/30) および CD スペクトル解析により行った。

(2) アビジン-ビオチンによるプルダウンアッセイ

p53Tet ペプチドおよびビオチン化した p53 四量体形成ドメインペプチド (各 10 μM) 混合物をアビジンビーズによりプルダウンした。洗浄後のビーズから 80% 酢酸によりペプチドを抽出し、逆相 HPLC により解析した。

(3) 生細胞中における p53 転写活性の解析系の構築

p53Tet ペプチドによる p53 転写活性の抑制は、当研究室が開発した蛍光レポーターシステムにより評価した (Imagawa, T. et al; Anal. Biochem. 387, 249-256, 2009)。p53 欠損型 NCI-H1299 細胞に、解析用プラスミド p53RE-mCherry(NLS)-hCMV-Venus-p53 を導入した。プラスミド導入後、ペプチドを添加し 11 時間培養後、細胞をホルマリン固定した。Hoechst33342 により細胞核を染色し、蛍光観察により細胞核内の Venus (緑色蛍光: p53 発現量) と mCherry (赤色蛍光: p53 転写活性) の蛍光強度を定量化した。

(4) p53Tet ペプチドの細胞導入および細胞内安定性の解析

細胞導入の解析については、p53 欠損型 NCI-H1299 細胞に、蛍光ラベル化した p53Tet ペプチドおよびグリシンを最終濃度 10 μM になるよう添加し、四時間培養した。細胞をホルマリン固定後、Propidium iodide により核染色し、蛍光観察により細胞へのペプチド導入を観察した。

安定性解析については、A549 (p53 野生型) に p53Tet ペプチド (最終濃度 5 μM) を添加し、4 時間培養後にペプチドなしの培地に交換した。ペプチドを添加してから、1、4、8、12、16、20、24、32、40、および 48 時間後の蛍光顕微鏡観察より、細胞内でのペプチドの安定性をモニターした。

(5) Western blotting による内在性 p53 の転写活性化能の解析

UV (15 J/m^2) 照射 A549 細胞 (p53 野生型) に、p53Tet ペプチドを最終濃度 10 μM になるよう添加し、24 時間培養後、細胞抽出液を回収した。SDS-PAGE 後、ブロッティングし、抗 p21 抗体(F-5)を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) ストラテジー

癌抑制タンパク質 p53 は、紫外線や放射線などの細胞ストレスに応答し、p21 をはじめとする下流遺伝子の転写を活性化、細胞周期停止およびアポトーシスの誘導を介して、ゲノムの完全性を維持している重要なタンパク質である。その活性化には、多量体形成ドメインを介したタンパク質のホモ四量体形成が必須であることが知られている。本研究では、p53 の四量体形成ドメインを基盤とし化学合成した阻害ペプチドと p53 タンパク質とのヘテロ四量体形成を介した活性阻害のストラテジーを考案した (図 1)。

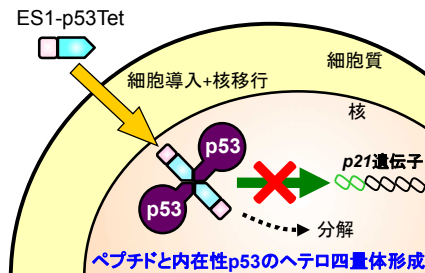


図1 p53Tet ペプチドによる p53 機能阻害

(2) p53Tet ペプチドの合成と構造解析

細胞導入促進配列および核移行シグナル配列を含む Effector Segment 配列 (ES1) を p53Tet (p53 四量体形成ドメインペプチド: 324-358 位) の N 末端に付加したペプチド: ES1-p53Tet をデザイン、化学合成した (図 2)。加えて、単量体型変異体 ES1-p53Tet3Ala についても合成を実施した。

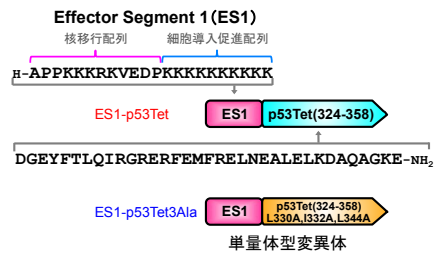


図2 p53Tet ペプチドの配列

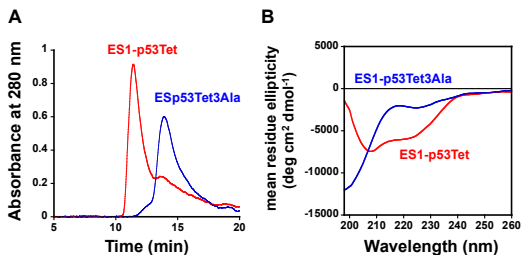


図3 p53Tet ペプチドの構造解析

(A) ゲル濾過, (B) CD スペクトル

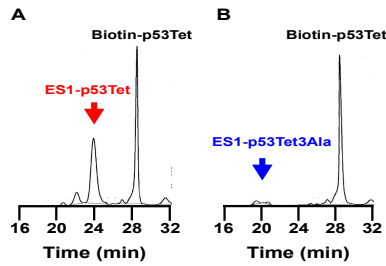


図4 p53Tet ペプチドのプルダウンアッセイ
(A) ES1-p53Tet, (B) ES1-p53Tet3Ala

合成した ES1-p53Tet ペプチドについて、CD スペクトル、ゲル濾過により立体構造を解析した結果、ES1-p53Tet が四量体を形成し、天然型 p53Tet ペプチドと同様の構造をとることが示された (図 3)。さらに、ビオチン化ラベル天然型 p53Tet とのプルダウンアッセイを実施した結果、ES1-p53Tet が天然型 p53 四量体形成ドメインとヘテロ四量体を形成することが示された (図 4)。一方、単量体型変異体である ES1-p53Tet3Ala については、ランダム構造であり、ヘテロ四量体の形成も見られなかった。

(3) ES1-p53Tet ペプチドによる p53 機能阻害

当研究室で開発したハイスループットな p53 活性アッセイにおいて、ES1-p53Tet ペプチドの効果を検討した。その結果、ES1-p53Tet は、p53 の転写活性を顕著に低下させた (図 5 A)。また、その効果は、濃度依存的であった。一方、四量体形成ドメインのみ p53Tet (Δ ES1) や四量形成能を欠損させた単量体型変異体ペプチド ES1-p53Tet3Ala については阻害効果を示さなかった (図 5 B)。

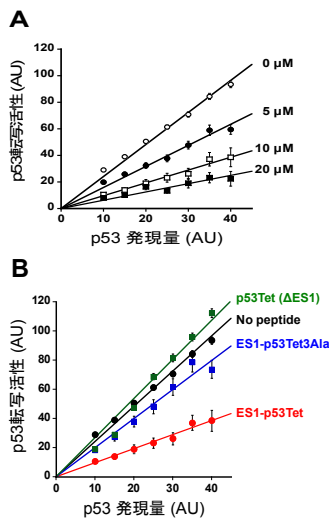


図5 p53Tet ペプチドの p53 転写活性阻害
(A) ES1-p53Tet, (B) p53Tet アナログ

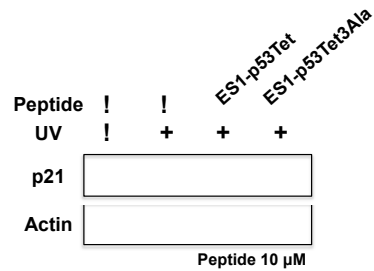


図6 pES1-p53Tet による p21 誘導阻害

さらに、ES1-p53Tet の培地への添加により正常型 p53 を持つ A549 細胞において活性化された内在性 p53 タンパク質の活性は抑制され、下流遺伝子産物 p21 の発現レベルは著しく低下した (図 6)。

(4) ES1-p53Tet ペプチドの細胞内取込みと安定性

ES1-p53Tet について、細胞への導入と局在および細胞内でのペプチド安定性を解析した。

蛍光ラベル化した ES1-p53Tet は、数時間の培地への添加により細胞に導入され、核に局在した (図 7)。一方、蛍光ラベル化 Gly は細胞への導入がまったく見られなかった。この結果は、細胞導入促進配列および核移行シグナル配列を含む Effector Segment 配列の有用性を示している。

さらに、蛍光ラベル ES1-p53Tet は、添加停止後、半日で半減し、2 日後にはほぼ完全に消失した (図 8)。

以上の結果より、ES1-p53Tet は、細胞内への導入性および、一過性ペプチド阻害剤としての分解性を有していることが示された。

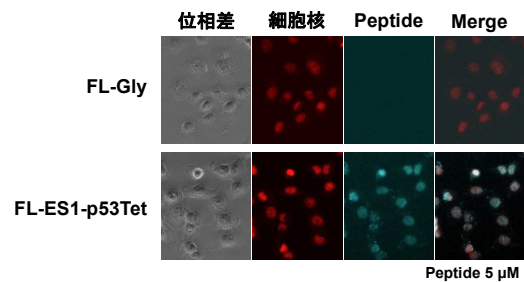


図7 ES1-p53Tet の細胞内への取込みと局在

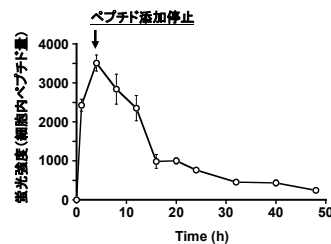


図8 ES1-p53Tet の細胞内安定性

以上より、今回合成した p53 四量体形成ドメインを基盤とした新規ペプチド阻害剤 ES1-p53Tet は末端に付加した ES1 配列によって効果的に細胞内に導入され、内因性 p53 タンパク質とのヘテロ四量体形成を介して、p53-p21 シグナル経路を効果的に阻害することが明らかになった。本研究により、「内在性 p53 タンパク質とのヘテロ四量体形成を介したペプチドによる p53 活性の一過性新規阻害法の有効性が示された。今後、本研究により開発した一過的 p53 阻害の方法論を基盤とし、iPS 細胞樹立の過程において実用化されることが期待される。

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 7 件)

1. T. Sakaguchi, J. I. Janairo, Y. Chuman, K. Hara, A. Fukuoka, and K. Sakaguchi, Silver nanocrystals formed by oligomeric biomineralization peptide via p53 tetramerization domain. *Peptide Sci.*, 2012, 57-58 (2013) 査読有
2. J. Wada, R. Kamada, Y. Chuman, T. Imagawa, and K. Sakaguchi, Inhibition of tumor suppressor protein p53-dependent transcription by a tetramerization domain peptide via hetero-oligomerization, *Bioorg Med Chem. Lett.*, 22, 2780-2783 (2012) 査読有 DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.02.085
3. H. Yagi, Y. Chuman, Y. Kozakai, T. Imagawa, Y. Takahashi, F. Yoshimura, K. Tanino, and K. Sakaguchi, A small molecule inhibitor of p53-inducible protein phosphatase PPM1D, *Bioorg Med Chem. Lett.*, 22, 729-732 (2012) 査読有 DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.10.084
4. Y. Han, H. Noguchi, K. Sakaguchi, and K. Uosaki, Formation process and solvent-dependent structure of a polyproline self-assembled monolayer on a gold surface. *Langmuir*, 27, 11951-11957, (2011) 査読有 DOI: 10.1021/la2020995
5. J. Wada, R. Kamada, Y. Chuman, T. Imagawa, and K. Sakaguchi, Repression of p53 transcriptional activity by inhibitory peptide via heterotetramerization, *Peptide Sci.*, 2011, 301-302 (2012) 査読有
6. T. Sakaguchi, R. Kamada, Y. Chuman, and K. Sakaguchi, Nanostructure formed by biomineralization peptide oligomerized via p53 tetramerization, *Peptide Sci.*, 2011, 345-346 (2012) 査読有
7. K. Uesugi, S. Oshima, A. Tanaka, T. Imagawa, and K. Sakaguchi, Development of screening system for tumor suppressor p53 activators and inhibitors, *Peptide Sci.*, 2011, 403-404 (2012) 査読有

[学会発表] (計 16 件)

1. J. Wada, et al., 癌抑制タンパク質 p53 の四量体形成ドメインにおけるアルギニン残基修飾の構造安定性に対する効果. 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013/6/12-14, とりぎん文化会館 (鳥取県)
2. J.I.B. Janairo, et al., Formation of Palladium Nanosponges by an Oligomerized Biomineralization Peptide through the p53 Tetramerization Domain. 第 49 回ペプチド討論会, 2012/11/7-9, かごしま県民交流センター (鹿児島県)
3. T. Sakaguchi, et al., Silver Nanocrystals Formed by Oligomeric Biomineralization Peptide via p53 Tetramerization Domain. 第 49 回ペプチド討論会, 2012/11/7-9, かごしま県民交流センター (鹿児島県)
4. K. Sakaguchi, Biomineralization and nanoparticle arrangement by Oligomeric Peptides. Cambodian Malaysian Chemical Conference 2012, 2012/10/19-21, Angkor Century Resort and Spa (カンボジア)
5. J. Wada, et al., 癌抑制タンパク質 p53 に対する一過性ペプチド阻害剤の開発. 日本化学会秋季事業-第 2 回 CSJ 化学フェスタ 2012, 2012/9/14-17, 東京工業大学 (東京都目黒区)
6. K. Sakaguchi, Control of Biomineralization and Nanoparticle Arrangement via Peptide Self-assembly. 14th Akabori Conference, 2012/9/10-14, ニセコ町民センター (北海道)
7. T. Higashi, et al., p53 標的遺伝子プロモーターに対する内因性 p53 依存的転写活性の蛍光解析系. 第 49 回日本生化学会北海道支部例会, 2012/7/20, 北海道大学 (札幌市)
8. T. Sakaguchi, et al., p53 四量体形成ドメインを介した多量体バイオミネラルイゼー

- ションペプチドによる銀粒子形成. 第 92 日本化学会春季年会, 2012/3/25-28, 慶應義塾大学 (横浜市)
9. J. Wada, et al., 癌抑制タンパク質 p53 転写活性に対するペプチド阻害剤. 第 92 日本化学会春季年会, 2012/3/25-28, 慶應義塾大学 (横浜市)
 10. K. Uesugi, et al., Development of screening system for tumor suppressor p53 activators and inhibitors. 第 48 回ペプチド討論会, 2011/9/27-29, 札幌コンベンションセンター (北海道)
 11. T. Sakaguchi, et al., Nanostructure formed by biomineralization peptide oligomerized via p53 tetramerization. 第 48 回ペプチド討論会, 2011/9/27-29, 札幌コンベンションセンター (北海道)
 12. J. Wada, et al., Repression of p53 transcriptional activity by inhibitory peptide via heterotetramerization. 第 48 回ペプチド討論会, 2011/9/27-29, 札幌コンベンションセンター (北海道)
 13. K. Sakaguchi, Arrangement of Nanoparticle and Biomineralization through Peptide Self-assembly. 14th Asian Chemical Congress 2011, 2011/9/5-8, The Queen Sirikit National Convention Center (タイ)
 14. T. Imagawa, et al., 生細胞蛍光イメージングを利用した癌抑制タンパク質 p53 の機能解析. 第 48 回日本生化学会北海道支部例会, 2011/8/5, 札幌医科大学 (札幌市)
 15. J. Wada, et al., ヘテロオリゴマー形成を介した p53 転写活性阻害ペプチドの開発. 日本化学会北海道支部 2011 年 夏季研究発表会, 2011/7/23, 室蘭工業大学 (室蘭市)
 16. K. Sakaguchi, Methylation of p53 Tetramerization Domain Arginine Residues Destabilizes the Tetrameric Structure. 22nd American Peptide Symposium, 2011/6/25-30, Sheraton Hotel and Marina (アメリカ)

[その他]

ホームページ等

<http://wwwchem.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

なし

(3) 連携研究者

なし