

平成21年5月24日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590305

研究課題名（和文） p53の熱力学的不安定性が個体に与える影響

研究課題名（英文） The impact of thermodynamically unstable p53 protein on organism.

研究代表者

谷口 善仁（TANIGUCHI YOSHIHITO）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00324616

研究成果の概要：

放射線照射前後の発現量に差がある p21 遺伝子をレポーターとして、p53 の DNA 結合領域の変異体三種の転写活性を RT-PCR により測定した。また、哺乳動物の p53 変異体で温度感受性になることが試験管内で知られている、I127A および A122V 変異を p53 欠失メダカに導入した。減数分裂を詳細に解析するために、大腸菌で発現させたメダカ Blm、Spo11、Dmc1 タンパク質をモルモットに免疫し、ウェスタンブロットと免疫抗体染色に使える特異性の高い抗体を得た。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：p53、メダカ、温度感受性、抗体、減数分裂、ブルーム症候群

1. 研究開始当初の背景

近年ゼブラフィッシュやメダカといった小型脊椎動物で、腫瘍遺伝学の研究が本格的になされるようになった。これらの生物種は体が小さいために、蛍光標識による in vivo での観察に向いているなど、マウスにはない特徴を兼ね備えている。特にメダカは放射線生物学はじめ、腫瘍の研究が日本で以前よりなされており、その知見の蓄積が豊富であるうえに、ゼブラフィッシュとは異なり近交系が存在するために、移植実験が容易である。しかし魚

類では逆遺伝学、いわゆる遺伝子ノックアウトができず、また順方向の遺伝学も表現型のアッセイが容易な発生生物学を主流としてきただけに、腫瘍の遺伝学というものはマウスを使用する実験系に比べてまだまだ立ち遅れている。

2002年に日本のグループが主体となってメダカのゲノムプロジェクトが始まったのを皮切りに、2004年には大規模な表現型スクリーニングがメダカを対象に行われた。さらに、2005年には申請者らが中心となり、TILLING

(targeting induced local lesions in genomes)法という方法で、メダカの特異的遺伝子を破壊のシステムが確立され、1年強の期間で、10種類以上ものノックアウトと数多くのミスセンス変異体を作成することに成功している。このようにメダカの遺伝学を取り巻く環境は急速に整備されつつある。

我々が作製した p53 遺伝子欠損メダカは、放射線照射で通常誘導される p21 の発現誘導が欠如しており、また、DNA 障害依存的なプログラム細胞死が起らない。また、野生型のメダカには自然発ガンはほとんど見られないが、p53 遺伝子を欠損しているメダカは、胸腺や鰓、腸管などにさまざまなガンが発生する。これら p53 欠損メダカ、および、メダカの遺伝子ノックアウトのシステムは、リサーチコミュニティから高い評価を受け、日本のみならず海外や、ゼブラフィッシュの研究者からも、多数の共同研究の問い合わせを受けている。このように、我々のシステムとリソースは魚類の分野で有用であり、非常にニーズが高い。

2. 研究の目的

魚類の遺伝学を進展させるうえで現在まだ不足しているのは、条件付遺伝子ノックアウトの技術と、抗体である。本研究ではこれらの問題点を解決するために、システムを開発、確立する。

条件付き遺伝子ノックアウトは、Cre-lox システムや、tet on-off システム、heat shock promoter を使ったシステムなどがゼブラフィッシュで試されている。これらのシステムはメダカにも応用可能であると考えられるが、メダカは、自然界では越冬する魚種であり、4℃から 40℃までの温度変化に耐えることができる。この性質を利用して、heat shock promoter に頼らない、個別蛋白質の熱安定性に基づいた温度感受性変異体の作製の可能性を模索する。p53 は、過去に多数の熱力学的解析や構造解析が行われており、このような温度感受性変異体作製に適している。すでに作製・解析済みの p53 ノックアウトメダカを用いて、p53 遺伝子座をカバーする BAC クローンを用い、温度依存性遺伝子 ON・OFF システムを開発、確立する。

また、魚類の変異体の解析は、多くの場合、in situ hybridization などによる mRNA の発現解析に限られる。これは、マウスやヒトの蛋白質を抗原にして作製された市販の抗体の多くが、魚類の蛋白質への交差性を持たないためである。免疫染色やウェスタンブロットによる解析の手法を広げるために、魚類タンパクに対する抗体産生の系を立ち上げる。

3. 研究の方法

申請者はすでに、完全ノックアウト (186 番目のチロシンが停止コドンに変化した Y186X アレル、および 241 番目のグルタミン酸が停止コドンに変化した E241X アレル) を含む p53 変異メダカを数種類単離している。この中の N220D および N220S 変異体は高度に保存された loop 3 という構造の中に突然変異が存在する。N220 (220 番目のアスパラギン) の隣のシステイン残基は、loop 2 のシステインとともに Zn イオンを結合し、p53 全体の構造の安定化に寄与する。文献的には、ヒト p53 の対応するアミノ酸 (N239) の置換により、タンパクの熱力学的安定性が変化する (アスパラギンが何に変わるかで、より安定にもより不安定にもなりうる) ことが示されている。よってメダカにおいてこれらのアミノ酸置換は、p53 タンパクのフォールディングに対して影響を及ぼす可能性がある。このメダカに対する凍結精子を融解し、野生型メダカ由来の卵と人工受精する。得られた稚魚 (ヘテロ接合体) を数度の戻し交配の後に兄妹交配してホモ化する。変異体メダカにガンマ線照射を行い、いくつかの温度条件下で p21 の発現誘導や、アポトーシスの誘導の程度を測定して、変異体 p53 蛋白質の熱不安定性を評価する。

ヒトでは V143A という p53 タンパクのアミノ酸変異が、温度感受性であることが知られている。この変異をメダカゲノムにノックインすることは、メダカ細胞の相同組換えの効率が低く、現在の技術では難しい。そこで、大腸菌での相同組み換え技術により、メダカ p53 遺伝子座をカバーする BAC クローンに V143A 変異を導入し、これを p53 ノックアウトメダカにインジェクションすることにより、p53 温度感受性メダカを作製する。この方法は、メダカ全ゲノムシーケンズプロジェクトの過程で作製された BAC ライブラリー、TILLING 法により作製された p53 欠損メダカ、および BAC トランスジェニックメダカ作製の技術により成り立つ。

魚類タンパクに対する抗体は、魚類特異的な部分が免疫原性が高いと考えられるため、そのような部位を大腸菌で発現させて抗原とする。可能な限り、ゼブラフィッシュ由来の蛋白質と交差性のあるように、抗原を設計する。免疫する動物は、抗原の量が少なくてもよいように、モルモットを使用する。抗体産生は、北海道大学大学院先端生命科学研究院先端生命分子科学分野 生体情報分子科学研究室の山下正兼研究室との共同で行った。

4. 研究成果

(1) p53 変異体の温度感受性の評価

p53 蛋白質の活性評価には、ガンマ線照射後の p53 標的遺伝子の発現誘導がもっとも適している。20Gy 照射 6 時間後の p21、mdm2、bax の発現誘導を semi-quantitative RT-PCR で定量すると、p21 の発現誘導が、ほとんど検出不可能な量から、劇的に増加することが明らかとなった。p21 発現誘導を簡便に、また、再現性よく測定するために、SYBR Green を用いた real time PCR による p21 mRNA レベルの測定を試みた。メダカゲノムデータベース上には、p21 相同遺伝子は 2 つあったが、放射線照射により発現が劇的に変化する遺伝子は、452 塩基対のイントロンを介在して、エキソンが 2 つから構成されていることがわかった。染色体 DNA と mRNA を区別するために、この遺伝子のイントロンをまたぐようにプライマーを設計したが、イントロンが比較的短いために、染色体 DNA も増幅されてしまった。RNA 抽出後に、DNase 処理を施すこと、cDNA テンプレートを希釈することにより、比較的安定して、p21 mRNA の定量が行えるようになった。

real time PCR に使用可能なその他のプローブを得るために、文献上知られている p53 標的遺伝子をメダカゲノム上で検索した。その結果、noxa を見つけることができた。一方、puma や p53AIP1 はメダカゲノム上に明らかな相同遺伝子がなく、p53 のターゲットは、種間で必ずしも保存されていない可能性が示唆された。

種間で高度に保存されている p53 の DNA 結合領域の変異体三種 (N221D (221 番目のアスパラギンがアスパラギン酸に変化した変異体、以下同様)、N221S、S223P) を野生型メダカに 4 回以上戻し交配した上で、兄妹交配によりホモ化した。放射線照射前後の発現量に差がある p21 遺伝子をレポーターとして、これら変異体 p53 の転写活性を RT-PCR およびリアルタイム PCR により測定した。ホモのペア由来の受精後 4 日胚に、20Gy の 137-Cs ガンマ線を照射し、28 度、および、35 度の温度下で、p21 の発現誘導レベルを検討した。その結果、これらの変異体メダカの p21 転写活性可能は、温度に関わりなく低下していることが判明した。すなわち、これらの変異体は、p53 の hypomorphic 変異体であるが、温度感受性変異体ではない。これらの結果は、ホモに変異を持つ個体の自然発ガン率からも支持された。これらの魚は、26 度の通常の温度で飼育した場合、ナンセンス変異体である Y186X や E241X と同レベルの死亡率を示した。このことは、ambient temperature において、これらのミスセンス変異体がすでに p53 の機能を喪失していることを示している。

アポトーシスの評価には、全胚照射後の

TUNNEL 染色や、ガンマ線照射を行った初代培養細胞の核の fragmentation を time lapse 顕微鏡観察する方法などがある。しかし、もっと簡便な方法として、アクリジンオレンジ全胚染色法を試した。受精 2 日後の胚にガンマ線を照射し、1 2 時間後に 17 μ g/ml アクリジンオレンジ溶液に 1 時間浸して、アポトーシスにより死亡した細胞を染色した。その結果、p53 変異体のアポトーシス誘導能が低下していることが明らかとなった。

(2) p53 温度感受性変異メダカの作製

p53 遺伝子座をカバーする BAC は、National BioResource Project-Medaka より得た。また、大腸菌内での相同組み換えを利用した BAC 改変システムは、米国 National Cancer Institute の Neal Copeland 博士より得た。ヒトで温度感受性になることが知られている V143 は、メダカ p53 では、I127 に相当する。このアミノ酸は、エキソン 5 によりコードされている。メダカ p53 遺伝子のエキソン 5 を含むゲノム DNA を PCR 増幅し、pCR2.1 ベクターにクローニングした。変異導入した合成オリゴヌクレオチドを用いて PCR することにより、クローニングした p53 エキソン 5 に I127A の変異を導入した。その他、温度感受性になることが期待される A122V 変異を導入したコンストラクトも同時に作製した。組換え体のポジティブセレクションが可能なように、イントロン 5 にカナマイシン耐性遺伝子 (後で切り出せるように、両末端に loxP 配列を持つ) を挿入した。このコンストラクト由来の PCR 産物を、野生型 p53 遺伝子 BAC を導入した組換え用大腸菌株 SW102 にエレクトロポレーションで導入し、変異 p53 遺伝子と、野生型 BAC との組換えを誘導した。組換え体は、ホモロジーのあるアームの内外での PCR 増幅により選別した。このクローンに Cre レコンビナーゼを作用させ、カナマイシン耐性遺伝子を除去した。魚類受精卵においては、DNA マイクロインジェクション時に I-SceI メガヌクレアーゼを作用させると、transgenesis の効率を上げることができることがわかっている。その目的のために、p53 遺伝子の 5'側に、I-SceI 制限酵素部位をアンピシリン耐性遺伝子とともに導入した。この BAC を大腸菌大量培養液より精製し、I-SceI メガヌクレアーゼとともに、Y186X-p53 欠損メダカの受精卵にインジェクションした。

(3) 抗体の作製

Blm ヘリカーゼは、染色体不安定性を示す常染色体劣性遺伝の疾患の原因遺伝子である。Blm 遺伝子を欠損するメダカは、精細胞の減数分裂時の染色体分配に問題が生じ、雄性不妊を示すことがわかった。メダカの精子形成はよく研究されていて、現在までに

SYCP1 などのシナプトネマ複合体の成分を染色する抗体は作製されていた。これらの抗体で減数分裂時の染色体を染めた結果、Blm 変異体では、染色体の対合は正常であることがわかった。Blm 遺伝子欠損体では相同染色体間の組換えが促進され、それが不分離につながっていることが考えられるが、詳細な解析には、相同染色体対合や交差に関与する蛋白質の免疫染色が欠かせない。

雄性不妊のメカニズムを詳細に解析するために、メダカの BLM ヘリカーゼ、および、Spo11、Dmc1、Mlh1 タンパク質に対する抗体を作製した。それぞれに His タグを付けた蛋白質を大腸菌で発現させ、ニッケルカラムを用いてタンパクを精製した。BLM は大きなタンパクだったので、N 末端側と C 末端側に分けて発現させた。BLM と Dmc1 は可溶性画分に分離したが、Spo11 は不溶性画分に分離した。Mlh1 はさまざまな truncate タンパクを試したり、発現誘導の方法を試みたが、どの場合でも発現量が極めて少なかった。Mlh1 以外の精製タンパクをモルモットに免疫し、それぞれ特異性の高い抗体を得ることができた。これらは、ウェスタンブロットに使用できるのみならず、減数分裂時の染色体標本の免疫抗体染色にも使えることがわかった。抗 Dmc1 抗体は、その近縁タンパクである Rad51 と交差せず、Dmc1 特異的であることが確認できた。なお、Rad51 タンパクは種間で非常によく保存されており、市販の抗体をメダカ Rad51 タンパクの染色に用いることができた。

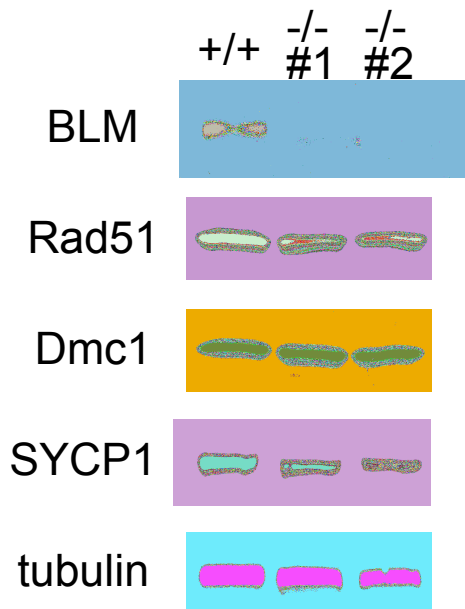


図1 野生型と、Blm 欠損メダカ 2 尾から抽出したタンパクに対するウェスタンブロット。

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 1 件)

谷口善仁、武田俊一 魚類を利用した創薬実験医学 27:805-810, 2009

〔学会発表〕(計 1 件)

谷口善仁、岩井俊治、山下正兼、武田俊一 メダカ精母細胞の減数分裂を制御する相同組換え関連因子 BLM ヘリカーゼ
第 31 回日本分子生物学会年会
2009 年 12 月 9 日 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 善仁 (TANIGUCHI YOSHIHITO)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00324616

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし