

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08202

研究課題名（和文）C末端欠損p53の活性化亢進機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of hyperactivation of p53 lacking C terminal domain

研究代表者

中根 貴弥（Nakane, Takaya）

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：90422683

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：p53のカルボキシル末端（CTD）を欠く変異体は、p53機能亢進により、マウスホモ体は重症骨髄不全で早期に死亡する。CTD欠失と表現型の関係を調べるために、不完全および完全CTD変異をもつ2種類の遺伝子編集マウスを作成すると同時に、野生型p53とCTD欠失p53をトランスフェクトしたK562細胞を用いて、ヘミン誘導性赤血球の分化への影響を、ヘモグロビン陽性率を用いて検討した。CTD欠失p53変異は、部分欠失が重症、完全欠失は軽症。部分欠失ヘテロ体が雄性不妊を示すことをはじめて発見した。2つのアレルのp53変異は相加的に重症度を決める。P53のCTDは、赤血球様細胞分化に促進的に作用する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CTDのp53機能制御メカニズムへの関与を明らかにしたことは、p53の機能低下・亢進で生じるがんや骨髄形成不全などの治療法の開発に役立つ。P53のCTD欠失ヘテロマウスでの雄性不妊発見は、ヒトでもp53のCTD欠失が男性不妊の原因である可能性を示し、新たな病態の解明や治療法の開発に資する。P53のK562細胞に対する赤血球様分化にCTDが促進的に作用していることの解明は、K562が慢性白血病細胞から樹立された細胞株であることを鑑みれば、p53のCTD分子や、CTDに対する抗体などを用いた腫瘍細胞の治療法開発に役立つ。

研究成果の概要（英文）：Mutants lacking the carboxyl terminal (CTD) of p53 lack the MDM2/4 binding site and results in p53 hyperactivation; mouse homozygotes carrying p53 lacking CTD have severe bone marrow failure and die early. To examine the relationship between the extent of CTD deletion in p53 and phenotype, we generated two types of gene-edited mice with incomplete and complete deletion of the CTD. In addition, using K562 cells transfected with wild-type p53 and p53 lacking CTD, the effect of CTD in p53 on hemin-induced erythroid differentiation was examined by measuring hemoglobin positive cells. We found that, first, partial CTD deletion caused much severer phenotype than complete CTD deletion did, and the male sterility was found in mice with incomplete CTD deletion for the first time, second, p53 lacking CTD mutations in two alleles are additive in severity of the phenotype, third, CTD of p53 acts in a promotive manner with respect to erythroid-like cell differentiation effects.

研究分野：小児科学

キーワード：p53

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

p53 のカルボキシル末端 (CTD) は、非特異的な DNA 結合ドメインであり、翻訳後に広範な修飾を受ける。p53 CTD を欠く変異体は、p53 タンパク質が MDM2/4 結合部位を欠くため、MDM2/4 による p53 転写活性の阻害を免れ、p53 機能亢進が起こる。CTD 欠失マウス (末端から 24 残基、あるいは 31 残基) のホモ体は骨髄不全が重症で、生後 1 か月以内に死亡する (Simeonova et al., 2013; Hamard et al.)。CTD 欠失 p53 ヘテロ体マウスは、無症状、あるいはきわめて軽微な症状しか示さない。最近、私たちはヒト CTD 欠失 p53 ヘテロ体 2 名 (S362fs) を報告した (Toki et al., 2018)。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、p53 の CTD 欠失の germline 変異の表現型を決定する要因をしらべることである。さらに、我々は、造血幹細胞の減少の他に、造血幹細胞の赤芽球系への分化障害が、p53 の CTD 欠失による重症貧血の原因の一つではないかと考え、これまでに調べられたことのなかった、造血幹細胞の赤芽球系への分化における p53 の CTD の関与について K562 細胞を用いた実験をおこなった。

3. 研究の方法

欠失範囲と表現型の関係を調べるために、ヒトの変異を忠実に模した変異 (S359fs) と、テトラマードメインから C 末側が完全に欠失した変異 (E354fs) をもつ 2 種類の遺伝子編集マウスを作成し、表現型を検討した。野生型 p53 と CTD 欠失 p53 (S362fs) をトランスフェクトした K562 細胞を用いて、p53 の CTD がヘミン誘導性赤血球の分化に影響を与えるかどうかを、ヘモグロビン陽性率、細胞周期、および BCR-ABL、リン酸化 ERK1/2 の発現等を用いて検討した。

4. 研究成果

マウスの実験

ヒトでみつかった p53 の CTD 不完全欠失変異を忠実に模倣した変異 (C 末端から 32 残基欠失。マウスでは S359fs) を導入して作成した遺伝子編集マウスは、ヘテロ体で精線萎縮が著しかった。雄性不妊のため、ホモ体を作成できなかった。雄性不妊は今までの p53 の CTD 不完全欠失変異マウスの報告ではみとめられなかった。雌ヘテロ体と野生マウスを掛け合わせて得られた子マウスは、通常の出産匹数よりも数が少なかったが、性別や遺伝子型はメンデル比にしたがっていた。

BFU-E (1 週間後)、CFU-E (72 時間後) は、高度に低下していた。しかし、ヘテロ体では軽度の貧血をみとめたものの、早期死亡はなく、著しく重症であったとはいえない。

p53 の CTD が完全に欠失すると表現型は軽症化した。症状もむしろ軽症化した。ヒト・マウスでは CTD の完全欠失した p53 の表現型を調べた報告はデータベースを調べた限りではなかった (IARC TP53 Database; <https://tp53.isb-cgc.org/>)。

完全 CTD 欠失と不完全 CTD 欠失の複合ヘテロ体を作成したところ、意外なことに、きわめて重症な表現型を示した。複合ヘテロ体はあきらかに体格が小さかった。野生型マウス、不完全 CTD 欠失ヘテロ体、完全 CTD 欠失ヘテロ体および完全 CTD 欠失ホモ体は 1 年間の観察期間で死亡例はほとんどみとめなかったが、一方、複合ヘテロ体はすべて生後 1 か月以内に死亡した。

以上の実験結果から、CTD 欠失 p53 変異は、部分欠失が重症、完全欠失は軽症。部分欠失ヘテロ体が雄性不妊を示すことをはじめて発見した。2 つのアレルの p53 変異は相加的に重症度を決める、ことがわかった。

K562 細胞を用いた実験

ヒト p21 プロモーターの活性化をルシフェラーゼアッセイで測定したところ、p53S362fs は野生型 p53 に比べ有意に活性が高かった。p53S362fs による p53 下流遺伝子の転写活性の上昇は、以前にも観察された (Toki et al., 2018)。一方、p53K357fs (完全 CTD 欠失) は野生型 p53 よりも有意に活性が低く、モック処理した K562 細胞とほぼ同等の活性であった。この実験結果は、CTD 不完全欠失マウスが、完全欠失マウスよりも表現型が重篤であった結果と一致している。

Hemin 添加後 3, 7 日目のヘモグロビン陽性率は、野生型 (WT) p53 導入 K562 細胞で最も高く、次いで p53S362fs 導入 K562 細胞、モック処理 K562 細胞であった。Hemin 添加後 7 日目のヘモグロビン陽性率は、野生型 p53 導入 K562 細胞で最も高く、次いでモック処理 K562 細胞、p53S362fs 導入 K562 細胞であった。

ヘミン投与後の ERK リン酸化の低下が、ヘミンによる K562 細胞の赤血球様細胞分化の最初に生じることがわかっている。野生型 p53 を導入した K562 細胞では、ヘミン投与後 (30 分~6 時間) の ERK リン酸化の低下は、モック処理した K562 細胞と同程度であった。p53S362fs を導入した K562 細胞では、ヘミン投与後の ERK リン酸化は一旦上昇し (10 分) その後下降する (1~6 時間)。

以上の実験結果から、p53 の CTD は、K562 細胞に対する p53 のヘミン誘導性赤血球様細胞分化作用に関しては促進的に作用していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CTD の欠失による p53 機能の影響、および p53 の二つのアレルの変異が相加的に表現型に影響するなど、CTD の p53 機能制御メカニズムへの関与を明らかにしたことは、p53 の機能低下・亢進で生じるがんや骨髄形成不全などの治療法の開発に役立つ。P53 の CTD 欠失ヘテロマウスでの雄性不妊発見は、ヒトでも p53 の CTD 欠失が男性不妊の原因である可能性を示し、新たな病態の解明や治療法の開発に資する。P53 の K562 細胞に対する赤血球様分化に CTD が促進的に作用していることの解明は、K562 が慢性白血病細胞から樹立された細胞株であることを鑑みれば、p53 の CTD 分子や、CTD に対する抗体などを用いた腫瘍細胞に対する新規の治療法開発に役立つ。

< 引用文献 >

Hamard PJ, Barthelery N, Hogstad B, Mungamuri SK, Tonnessen CA, Carvajal LA, Senturk E, Gillespie V, Aaronson SA, Merad M, Manfredi JJ. The C terminus of p53 regulates gene expression by multiple mechanisms in a target- and tissue-specific manner in vivo. *Genes Dev.* 2013 Sep 1;27(17):1868-85. doi: 10.1101/gad.224386.113. PMID: 24013501; PMCID: PMC3778241.

Simeonova I, Jaber S, Draskovic I, Bardot B, Fang M, Bouarich-Bourimi R, Lejour V, Charbonnier L, Soudais C, Bourdon JC, Huerre M, Londono-Vallejo A, Toledo F. Mutant mice lacking the p53 C-terminal domain model telomere syndromes. *Cell Rep.* 2013 Jun 27;3(6):2046-58. doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.028. Epub 2013 Jun 13. PMID: 23770245.

Toki T, Yoshida K, Wang R, Nakamura S, Maekawa T, Goi K, Katoh MC, Mizuno S, Sugiyama F, Kanezaki R, Uechi T, Nakajima Y, Sato Y, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Shiozawa Y, Kataoka K, Shiraishi Y, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Kamio T, Sakaguchi H, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Kanno H, Miyano S, Kojima S, Ishiguro A, Sugita K, Kenmochi N, Takahashi S, Eto K, Ogawa S, Ito E. De Novo Mutations Activating Germline TP53 in an Inherited Bone-Marrow-Failure Syndrome. *Am J Hum Genet.* 2018 Sep 6;103(3):440-447. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.07.020. Epub 2018 Aug 23. PMID: 30146126; PMCID: PMC6128301.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	矢ヶ崎 英晃 (Yagasaki Hldeaki) (00377540)	山梨大学・大学院総合研究部・講師 (13501)	
研究分担者	成澤 宏宗 (Narusawa Hiromune) (70808013)	山梨大学・大学院総合研究部・臨床助教 (13501)	

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