

機関番号：11401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790620

研究課題名 (和文) p53 ドミナント・ネガティブ変異体の同定および機能解析

研究課題名 (英文) Isolation and functional analysis of the p53 dominant-negative mutants.

研究代表者

大塚 和令 (OTSUKA KAZUNORI)

秋田大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90375072

研究成果の概要 (和文)：野生型 p53 発現プラスミドを HIS、URA3 を利用して  $\alpha$  接合型出芽酵母株に導入した。一方、網羅的 p53 ミスセンス変異ライブラリーは、 $\alpha$  接合型出芽酵母株に EGFP レポータープラスミドと 2314 種類の変異 p53 発現プラスミドをそれぞれ TRP1、LEU2 を利用して導入した。 $\alpha$  接合型出芽酵母株と 2314 種類の  $\alpha$  接合型出芽酵母株を YPD プレート上で接合したコロニーを SC-trp-leu-his-ura プレートと 5-FOA 含有 SC-trp-leu-his プレートそれぞれに移しコロニー形成能を観察し、ドミナント・ネガティブ変異体のスクリーニングを行った。

研究成果の概要 (英文)：The yeast haploid strain (*MAT $\alpha$* ) was transformed with wild-type p53 expressing plasmid using HIS and URA3 makers. On the other hand, the p53 missense mutation library was constructed by introducing the EGFP reporter plasmid and each of the 2314 mutant p53 expressing plasmids into the yeast haploid strain (*MAT $\alpha$* ) using TRP1 (for EGFP plasmids) and LEU2 (for mutant p53 plasmids) makers in a comprehensive manner. The yeasts harboring mutant p53 expressing plasmid and EGFP reporter plasmid were mated with the wild-type p53 expressing yeast on the YPD plates. The mating diploid cells were transferred to the SC-trp-leu-his-ura plates and 5-FOA-containing SC-trp-leu-his plates. We investigated the colony formation of each diploid cells and screened the dominant-negative p53 mutants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：腫瘍内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般 (含心身医学)

キーワード：内科、TP53 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

・TP53 遺伝子によりコードされる p53 タンパク質 (以下 p53) は細胞に障害が加わると活性化し、種々の標的遺伝子に塩基配列特異的に結合し、その遺伝子産物を発現させることで、細胞周期停止やアポトーシス誘導など癌抑

制に働く。TP53 変異はヒト腫瘍全体の約 50% にも認められ、その約 75% はミスセンス変異であり、1 アミノ酸置換により DNA 結合能が低下することが機能喪失の主因であるとされる。

・TP53 変異の種類によりp53 の機能に及ぼす機能障害の程度は異なる。申請者らは、TP53 各変異のp53 に及ぼす機能障害を評価するため、TP53 の1塩基置換により生じうる 2314 種類全てのミスセンス変異をp53 cDNA上に構築した網羅的変異p53 ライブラリーを作成し、変異p53 の転写活性化能を出芽酵母で評価した (Kato S, Otsuka Kら、Proc Natl Acad Sci U S A 100: 8424-8429 ;2003)。

・p53 はその4分子がテトラマーを形成して複合体の形で機能する。p53 変異体には野生型 p53 と結合しオリゴマーを形成し、野生型 p53 の機能をも抑制するドミナント・ネガティブ変異が知られている。その一方、野生型 p53 とオリゴマーを形成しても野生型 p53 の機能をあまり抑制しない劣性 (recessive) 変異体も存在する。

・ドミナント・ネガティブ変異体は recessive 変異体に比べ、より pathogenesis が強いと考えられる。すなわち、ある細胞の TP53 アレルに recessive 変異が生じて、もう一方のアレルが野生型として存在していれば p53 のがん抑制機能は保たれるのに対し、一方のアレルにドミナント・ネガティブ変異が存在する場合は、野生型アレルが残存していても p53 の機能は抑制され、腫瘍の形成・増大につながる。

・一方、各種の TP53 遺伝子発現ベクターにより TP53 遺伝子を外因性に腫瘍細胞内に導入し抗腫瘍効果を目指す遺伝子治療がこれまでに行われてきたが、その効果は必ずしも充分ではない。その理由のひとつに、腫瘍細胞に TP53 ドミナント・ネガティブ変異が存在する場合、導入した野生型 p53 の機能が変異 p53 により阻害され、十分な p53 のがん抑制効果が発揮されない可能性が考えられる。すなわち、腫瘍細胞の TP53 変異がドミナント・ネガティブ変異かどうかを知ることは

p53 遺伝子治療の結果を解釈する上で重要な知見である。

・更に、ドミナントネガティブ変異体タンパク質の構造を解析することでドミナントネガティブ作用を打ち消す小分子化合物の設計を可能たらしめ、p53 遺伝子治療をより効果的なものとする可能性があると考えられる。

・ドミナント・ネガティブ変異の存在は以前から知られていたが、実際に野生型p53 と共発現して転写活性化能に関するドミナント・ネガティブ効果が調べられた変異の種類は少ない。一方、申請者らはTP53 の1塩基置換により生じうる 2314 種類全てのミスセンス変異を含む網羅的変異p53 ライブラリーを有しており (Kato S, Otsuka K ら、Proc Natl Acad Sci U S A 100: 8424-8429 ;2003)、このライブラリーを用いたアッセイ系により2314 種類全てのTP53 ミスセンス変異についてそのドミナント・ネガティブ効果を解析することが可能である。申請者らはあるp53 変異体と別のp53 変異体が対となってオリゴマーを形成することにより、あるTP53 変異により低下したp53 機能が回復することを示し (Otsuka K ら、Int J Cancer 121: 559-566, 2007)、異なるp53 変異体同士がオリゴマーを形成することでp53 の機能に相乗的な修飾が加わる現象に着目しており、ドミナント・ネガティブ変異の詳細な解析を試みようとする着想に至った。

## 2. 研究の目的

・TP53 各変異の病的意義をドミナント・ネガティブ効果の面からより詳細に評価せしめ、さらには TP53 による遺伝子治療をより効果的なものにするべく、既に申請者らが作成した網羅的変異 p53 ライブラリーを用いてどの p53 変異体が野生型 p53 に対するドミナント・ネガティブ変異体として作用するのか網

羅的に解析・同定することが目的である。

また、ドミナント・ネガティブ変異体が p53 変異体の中で占める割合や、ドミナント・ネガティブ変異体の腫瘍細胞における出現頻度、また各ドミナント・ネガティブ変異体のみでオリゴマーを形成した際の機能などを総合的に評価した TP53 機能データベースを構築する。かかるデータベースは各 TP53 変異の病的意義を詳細に検討することを可能とする。

本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義は以下のように考える。

・本研究では変異 p53 におけるドミナント・ネガティブ効果について網羅的な解析を行い、膨大なデータベースを供給することを可能とするが、これは申請者らが作成した網羅的 TP53 ミスセンス変異ライブラリーの存在により初めて可能となる点で、非常に独創的なものである。結果、TP53 変異の一部がドミナント・ネガティブ変異であることが予想される。ドミナント・ネガティブ変異体は野生型 p53 が共存する場合でも腫瘍の形成・増大に寄与することが示唆され、より病的意義の大きい変異体であると考えられ、そのような変異体を同定することは各 TP53 変異の病的意義を解釈する際に重要な指針となる。さらに TP53 ドミナント・ネガティブ変異をもつ腫瘍細胞には野生型 TP53 を導入する TP53 遺伝子治療の効果が現れにくい可能性があり、TP53 遺伝子治療の際、腫瘍細胞の TP53 変異を調べることでその効果の予測を可能たらしめる可能性がある。さらには、タンパク質構造解析、構造シミュレーションにより同定した p53 ドミナント・ネガティブ変異体の構造解析を行うことにより、どのような構造変化がそのドミナント・ネガティブ作用をもたらすかを解明できれば、ドミナント・ネガティブ作用を抑制する小分子化合物の設計に

つながる。TP53 ドミナント・ネガティブ変異を有する腫瘍細胞に TP53 遺伝子治療を行う際、かかる小分子化合物を併用投与することにより、より TP53 遺伝子治療の有効性を高められる可能性があり、本研究はそのような戦略にも重要な指針となり得る可能性を持つ。

### 3. 研究の方法

(1)野生型 TP53 発現プラスミドを栄養要求性マーカー ADE2、URA3 を利用して  $\alpha$  接合型出芽酵母株 YPH500 に導入する。一方、網羅的 p53 ミスセンス変異ライブラリーは、 $\alpha$  接合型出芽酵母株 YPH499 に 2314 種類の変異 TP53 発現プラスミドと EGFP レポータープラスミドをそれぞれ栄養要求性マーカー LEU2、TRP1 を利用して導入してある。尚 EGFP レポータープラスミドには WAF1 の p53 応答配列を挿入してある。YPH500 株と 2314 種類の YPH499 株を YPD プレート上で接合し、SC-trp-leu-ade-ura プレート上に移し 37°C で 48 時間培養する。かかる手技により、3 種類のプラスミド(野生型 p53 発現プラスミド、変異 p53 発現プラスミド、EGFP レポータープラスミド)を持つ 2 倍体細胞を増殖させ、形成したコロニーが発する蛍光 (EGFP) についてその蛍光強度を観察する。変異 p53 発現プラスミドから生成される変異 p53 がドミナント・ネガティブ変異であった場合、その変異 p53 は野生型 p53 の WAF1 プロモーターへの結合を阻害するため、EGFP 蛍光強度が低下する。このアッセイにより、2314 種類の変異 p53 についてそのドミナント・ネガティブ効果を解析し、ドミナント・ネガティブ変異を同定する。

(2)同定したドミナント・ネガティブ変異 TP53 につき、哺乳類細胞用のプラスミドに導入する作業を開始する。

(3)ドミナント・ネガティブ変異 TP53 の哺乳

類細胞用の発現プラスミドに導入する作業を完了する。

(4) 作成した変異 p53 発現プラスミドを野生型 p53 発現プラスミドとルシフェラーゼレポータープラスミドと共に哺乳類細胞（ここでは TP53 の欠失した Saos-2 細胞を使用する）に共発現させる。Saos-2 細胞内で発現した変異 p53 がドミナント・ネガティブ変異であれば、野生型 p53 の転写活性化能を阻害し、ルシフェリンを加えた際の発光が減少する。酵母細胞内での現象が哺乳類細胞内でも再現されるか否かを確認することができる。

(5) 哺乳類細胞内にドミナント・ネガティブ変異 p53 と野生型 p53 を共発現させた場合に p53 のアポトーシス誘導能が阻害されるか否か、FACS により解析する。

(6) 上記で得られた結果を統合した包括的データベースを作成する。すなわち、すでに申請者らが作成した網羅的網羅的変異 p53 ライブラリーに各 TP53 変異体に関するドミナント・ネガティブ作用の情報を付加し、腫瘍での報告頻度や転写活性化能との相関性を解析し、各変異体の病的意義の更なる詳細な解析を可能とする。

#### 4. 研究成果

野生型 p53 発現プラスミドを HIS、URA3 を利用して  $\alpha$  接合型出芽酵母株に導入した。一方、網羅的 p53 ミスセンス変異ライブラリーは、 $a$  接合型出芽酵母株に 2314 種類の変異 TP53 発現プラスミドと EGFP レポータープラスミドをそれぞれ LEU2、TRP1 を利用して導入した。 $\alpha$  接合型出芽酵母株と 2314 種類の  $a$  接合型出芽酵母株を YPD プレート上で接合したコロニーを SC-trp-leu-his-ura プレートと 5-FOA 含有 SC-trp-leu-his プレートそれぞれに移しコロニー形成能を観察し、ドミナント・ネガティブ変異体のスクリーニングを行った。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 和令 (OTSUKA KAZUNORI)

秋田大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90375072

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：