

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670569

研究課題名(和文)非侵襲的癌診断装置のための顕微レーザーラマン分光によるp53変異型構造解析

研究課題名(英文)The three dimensional structure study of p53 mutants by using microscopic laser raman spectroscopy aimed at developing a non-invasive cancer diagnostic system

研究代表者

瀬戸 泰之 (Seto, Yasuyuki)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：00260498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌抑制遺伝子p53はDNA変化(遺伝子変異)を防ぐ上で重要な役割を担いゲノムの守護神と言われているが、人の癌の約50%でp53自体の変異を認めその機能が失われている。本研究の目的は、顕微レーザーラマン分光によりp53変異蛋白質の機能喪失プロセスを明らかにすることにある。ラマン分光は物質にレーザーをあてた際、散乱される光を解析することで物質中の原子の状態を知ることができる分析手法であり、細胞を生きたまま観察できる利点をもつ。p53蛋白質中には亜鉛が1個含まれているが、この亜鉛由来の散乱光を検出可能にし、亜鉛の結合近傍の変異では亜鉛が失われ、蛋白質の立体構造が大きく変化していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Cancer is caused by DNA changes within cells. p53 is called the guardian of the genome, because it plays a key role in preventing the changes. About half of p53 in human cancers is either lost or mutated, which results in losing the function. The study aimed to observe how p53 mutants lose p53 original function by using microscopic laser raman spectroscopy. Raman spectroscopy is an analytical technique to observe scattered photons from a laser beam into the molecules. The frequency of the scattered photons has information on vibrational motions of atoms in molecules and is sensitive to molecular conformation and environment. The spectroscopy can be applied to in-vivo observation. p53 normal proteins have one zinc ion. We observed that the scattered photons attributed to Zn disappear in the spectra of mutants near the zinc binding site, and that loss of zinc induces the disruption of the normal structure.

研究分野：消化管外科学

キーワード：癌抑制遺伝子p53 蛋白質 変異 高次構造 顕微レーザーラマン分光 分子動力学シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

生体内では数万種類の蛋白質が作られ、酵素、情報伝達、構造維持など多種多様な機能の担い手となっている。蛋白質の機能は、適切な立体構造をとることで発現されるが、変異蛋白質の多くは、適切な立体構造をとることができずその機能を失い、疾患の原因となっている。従って、生細胞中での正常蛋白質の立体構造を明らかにすることは、蛋白質の機能を理解する上で不可欠であり、さらに変異蛋白質において、立体構造がどのように変化し機能を失うかを解析可能にすることは、疾患の理解さらには創薬などの治療法の開発に大きな進展をもたらすものとなり得る。

X線結晶解析、核磁気共鳴(NMR)による蛋白質の立体構造解析は急速な進歩を遂げ、蛋白質構造データバンク(PDB)には、蛋白質の5万近い立体構造が登録されている。しかし、X線結晶解析においては蛋白質を結晶化させる必要があり、NMRにおいては蛋白質を安定同位体でラベルする必要があるので、生きた細胞での測定は現状不可能である。さらに、変異蛋白質の中には細胞内で凝集し、不溶化するものが少なくなく、このような蛋白質を溶解し結晶化させることは難しく、変異蛋白質の立体構造解析は至難なものになっている。

2. 研究の目的

蛋白質の立体構造解析においてX線結晶解析や核磁気共鳴と比較し、蛋白質からの散乱光を対象とするラマン分光は構造についての情報は少ないが、蛋白質の結晶化や安定同位体によるラベルといった操作を必要せず、生細胞中の蛋白質をプローブなしで観察できる利点を持つ。散乱光が微弱であることが欠点であるが、顕微レーザーラマン分光を生体観察用に最適化することで、癌抑制遺伝子p53野生型蛋白質中に1個のみ含まれるZnイオン由来の散乱光を検出可能にした。本研究ではまず、無細胞系で合成したGST(Glutathione S-transferase)融合p53変異蛋白質を用い、野生型と変異型でZnイオン由来のピークや蛋白質高次構造由来のピークでどのような違いがみられるか解析し、さらに、生細胞中で同様の観察を試みる。ラマン分光データを蓄積することで、in vivoで癌組織の分子レベルの評価を可能とする装置開発の基礎を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

GST融合p53野生型及び変異型蛋白質について、既存の評価方法(抗体反応、円二色性スペクトル)と比較しながら、顕微レーザーラマン分光による構造解析を行っていく。立体構造の熱安定性についても評価を行う。さらに、p53欠損細胞株にp53野生型またはZnイオン結合サイト近傍の点変異であるR175HやC242S変異型遺伝子を導入し、p53蛋白質

のin situ構造解析も行う。これらの測定を行う中で、顕微レーザーラマン分光によるin situ測定方法の最適化を行い、生細胞での観察を可能にする。p53の活性を復活させることができる化合物として低分子化合物PRIMA-1が報告されているが、この作用メカニズムについても顕微レーザーラマン分光で解析を行う。分子動力学シミュレーションもあわせて行い、変異蛋白質の変性メカニズム及びPRIMA-1の作用部位を明らかにしていく。

4. 研究成果

p53野生型蛋白質が活性を持つ上で中心的役割を担っているセントラルDNA結合コアドメインは、亜鉛イオン一個に配位結合し、シートリッチな二次構造を有しているが、亜鉛欠乏下で合成したGST融合p53野生型蛋白質では、ラマンスペクトル中でZnイオンとの配位結合に由来するZn-S結合のピークが消失し、シート由来のピークが大幅に減弱し、代わりにヘリックス由来のピークが増大した(図1)。以降、亜鉛存在下で合成したGST融合p53野生型蛋白質をWT(+)、亜鉛欠乏下で合成したGST融合p53野生型蛋白質をWT(-)と略記。

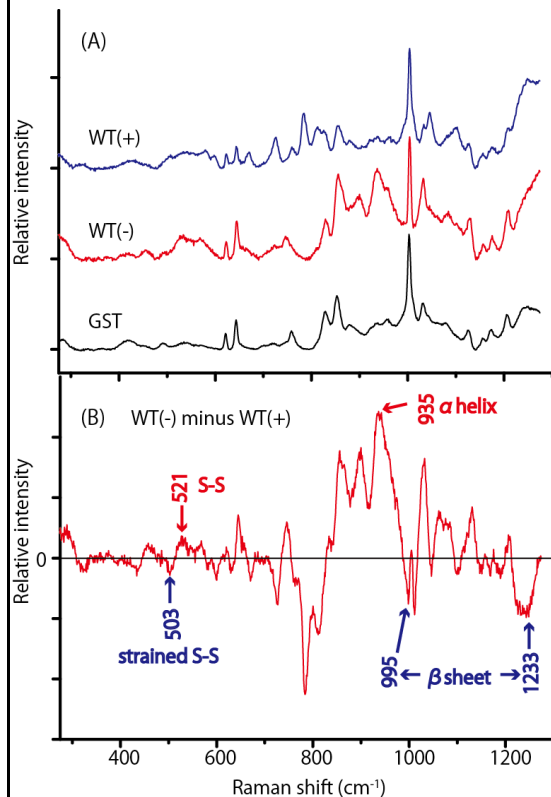


図1 (A) WT(+), WT(-)及びGSTのラマンスペクトル (B) WT(-)からWT(+))のスペクトルを引いた差スペクトル。回折格子は600g/mmを使用。

さらに遠紫外円二色性スペクトル解析も行い、ラマン解析と同様にWT(+))はWT(-)に比べシートリッチである結果を得た(図2)。

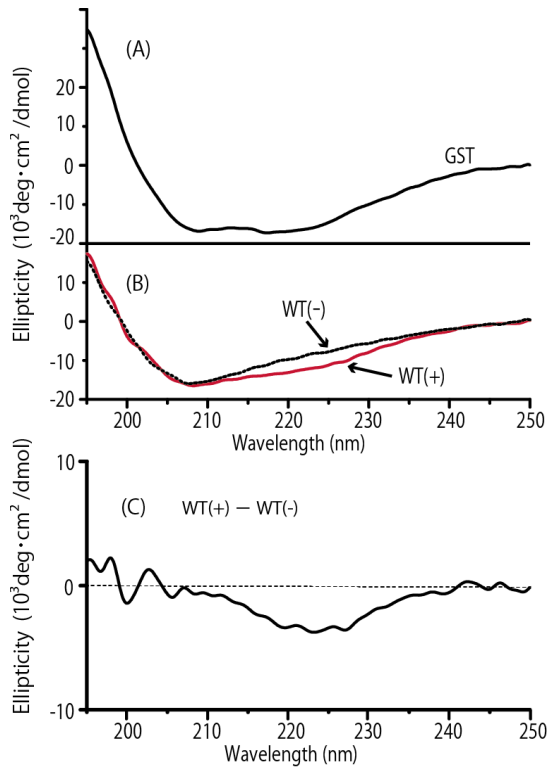


図 2 遠紫外円二色性スペクトル: (A) GST 単体 (B) WT(+) 及び WT(-) (C) WT(+) から WT(-) のスペクトルを引いた差スペクトル

亜鉛イオン配位結合近傍の変異である R175H 変異蛋白質については、GST 融合蛋白質の合成温度 (14 °C) では、Zn-S 結合ピークを認めたが、生体温度 (37 °C) では、Zn-S 結合ピークが消失し、ヘリックスリッチな二次構造への変化を認めるラマン解析結果であった。亜鉛イオンに直接配位結合する 242 番システイン残基の変異である C242S 変異蛋白質では、低温 (14 °C) でも亜鉛イオンと結合できず、ヘリックスリッチな構造へ変性したことを認めた (図 3)。

以上の結果より、R175H 変異や C242S 変異では、Zn イオンと配位結合できなくなるため変性することが示唆された。

p53 欠損細胞株である H1299 に p53 野生型または R175H 変異型遺伝子を一過性導入し、エタノール固定後、コンフォメーション特異的モノクローナル抗 p53 抗体を用い免疫染色を行い、それぞれの高次構造が維持されていることを確認した (図 4)。PAb1620 が野生型コンフォメーション特異的モノクローナル抗 p53 抗体、PAb240 が変異型コンフォメーション特異的モノクローナル抗 p53 抗体であり、発現確認のため、非特異的なポリクローナル抗 p53 抗体である CM1 で多重染色した。p53 野生型遺伝子を一過性導入した H1299 を H1299 WT、R175H 変異遺伝子を一過性導入した H1299 を H1299 R175H、p53 遺伝子を挿入していないプラスミドのみを導入した H1299 を H1299 null と略記している。

in situ ラマン解析を行った結果は、GST 融合蛋白質単体の場合と同様に、H1299 WT では

シートリッチ、H1299 R175H ではヘリックスリッチな二次構造を有しているとの解析結果であった (図 5)。

R175H 変異型の細胞株 SKBR-3 を用い、生きた状態での in situ ラマン解析を行い、定量解析可能なデータを得ることができた (図 6)。引き続き最適化検討を行っている。

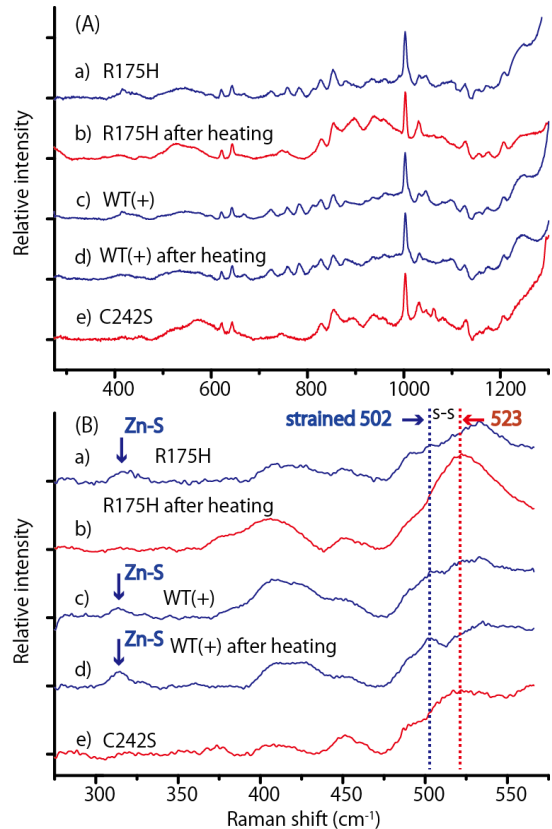


図 3 a) が R175H、b) が 37 °C、2 時間熱処理後の R175H、c) が WT(+), d) が 37 °C、2 時間熱処理後の WT(+), e) が C242S のラマンスペクトル。使用した回折格子は、(A) が 600g/mm、(B) が 1800g/mm。

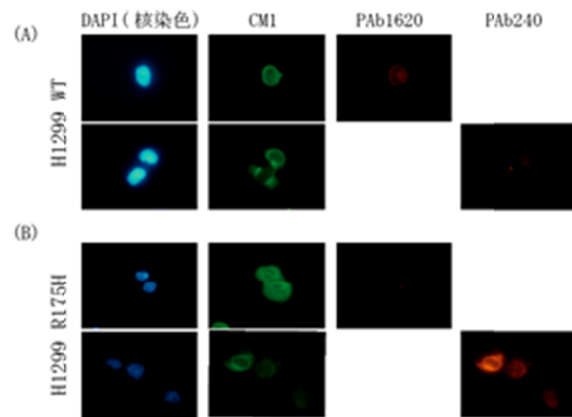


図 4 一過性 p53 遺伝子導入細胞株の蛍光免疫染色結果 (A) H1299 WT (B) H1299 R175H

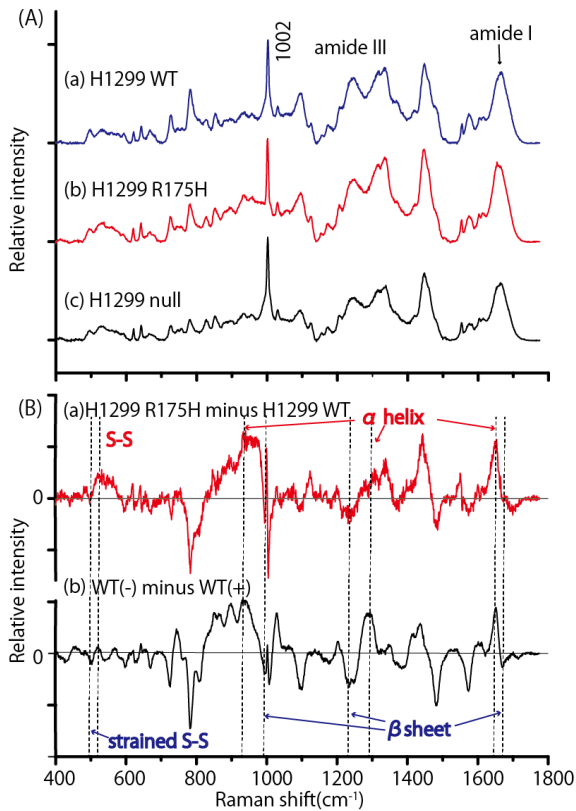


図5 (A)は(a)H1299 WT、(b)H1299 R175H及び(c)H1299 nullの細胞質中のラマンスペクトル、(B)は(a)がH1299 R175HからH1299 WTを引いた差スペクトル、(b)は比較としてWT(-)minus WT(+)

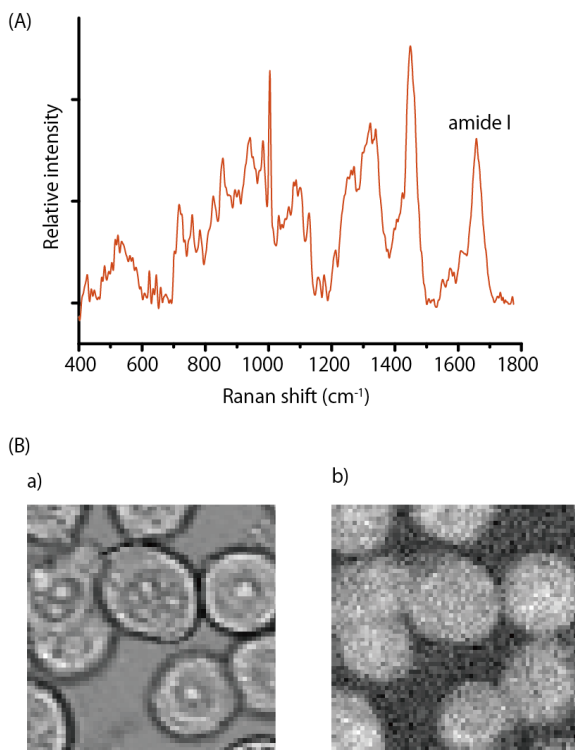


図6 (A)はSKBR-3生細胞のラマンスペクトルの一例、(B)aはSKBR-3生細胞の明視野像、b)はa)と同視野でamideを用いラマンイメージングした結果。

HCT1299、SK-BR-3、HCT116(p53野生型)や食道扁平上皮癌細胞株でp53野生型であるKYSE150、p53H179R変異型(R175H変異型と同様、亜鉛イオン配位結合サイトの変異)であるKYSE450に対して、p53変異型蛋白質の活性回復効果があると報告されているPRIMA-1を論文記載のプロトコルに従い添加し、コンフォメーション特異的抗体およびin situラマン分光によるp53変異型蛋白質の野生型への構造回復、MTT法によるcell viability評価を行った。ところが、複数回評価を試みたものの、我々の実験では、PRIMA-1によるp53変異型蛋白質の有意な活性回復効果を確認できず、シスプラチンとの併用効果も認めることができなかった(結果略)。そこで、抗がん剤に限定せず既存の治療薬の中からcell viabilityに影響を与える化合物の探索を行うこととした。KYSE150とKYSE450に対し細胞増殖抑制効果に有意な違いを認めるものがいくつかあることがわかり、現在、p53変異型蛋白質の活性回復効果を含めた包括的な解析を行っている。

p53セントラルDNA結合ドメイン(DBD)に対してAmber12により分子動力学シミュレーションを行った(図7)。亜鉛イオンを失ったDBD(apoDBD)では亜鉛イオン結合サイト近傍の構造が大きく変化する結果が得られた(図8及び9)。

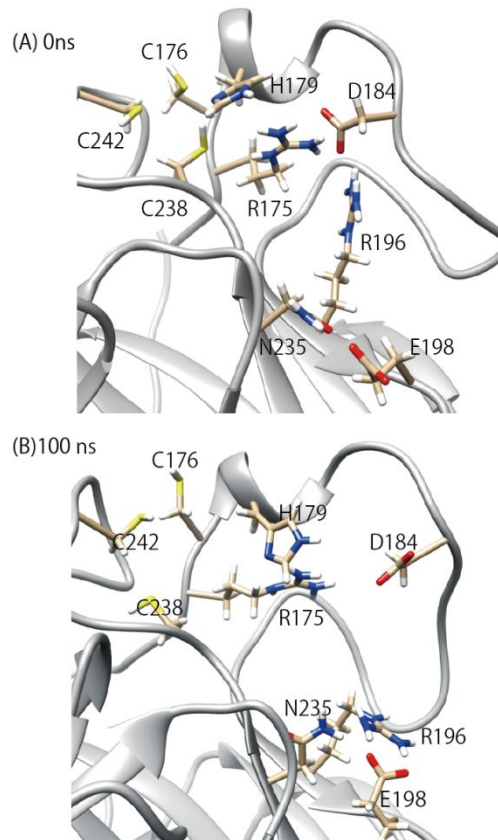


図7 apoDBDの分子動力学シミュレーション結果 (A)は亜鉛イオン配位結合サイト近傍の初期状態、(B)は100nsec経過後の亜鉛イオン配位結合サイト近傍。UCSF Chimeraを用い描出した。

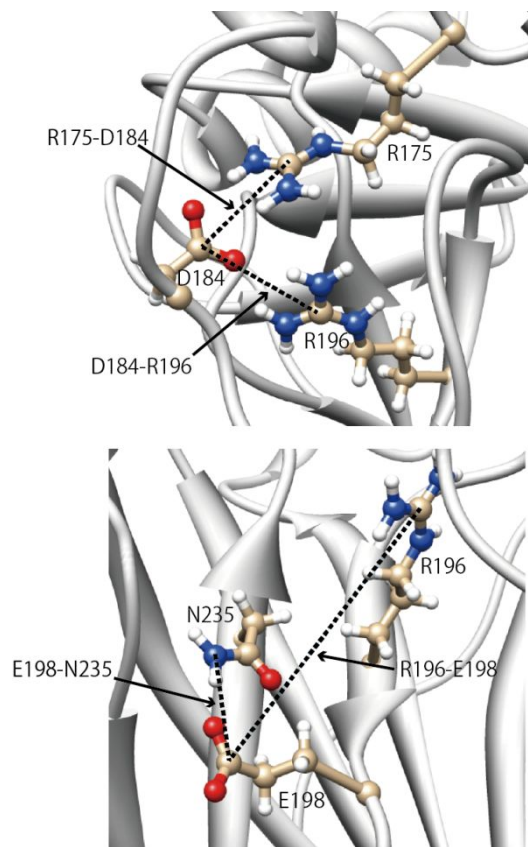


図8 残基間距離図示:R175-D184、D184-R196、R196-E198 及び E198-N235 をそれぞれ波線で示した。UCSF Chimera を用い描出した。

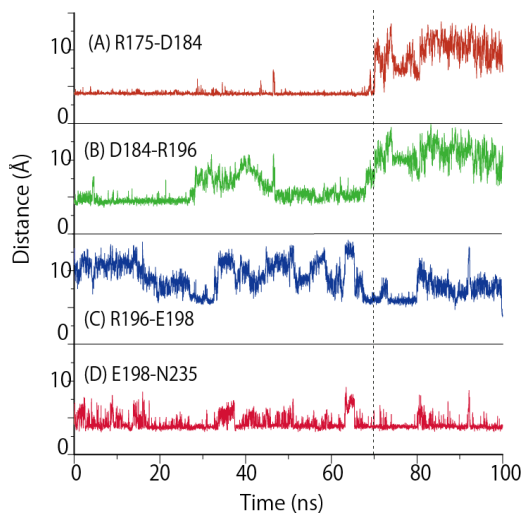


図9 apoDBD 中の残基間距離の分子動力学シミュレーションによる経時変化
(A) R175-D184 (B) D184-R196 (C) R196-E198 (D) E198-N235

特に、175 番のアルギニン残基(R)と 184 番のアスパラギン酸(D)残基間の水素結合の切断が観測されたことは、R175H 変異では、D184 と水素結合が形成できずに変性が起こっていることを推察させる結果であった。実際の変異型の構造まで変化させるためには蛋白質分子間の相互作用の影響も大きいと考え、

多量体シミュレーションを行う予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

吉島哲、松永智子、梁明秀、瀬戸泰之、
In vivo structural analysis of mutant p53 protein by using microscopic laser raman spectroscopy、日本癌学会 2013

〔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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

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

瀬戸 泰之 (Seto Yasuyuki)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 00260498

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: