

論文の内容の要旨

論文題目 *p53AIP1*, a Potential Mediator of p53-Dependent Apoptosis, and Its Regulation by Ser46-phosphorylated p53

和訳 p53依存性アポトーシスを仲介する*p53AIP1*遺伝子の単離及びSer46のリン酸化を受けたp53による発現制御

指導教官 武谷雄二教授

平成9年4月進学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 織田 克利

〔緒言〕

p53 蛋白は DNA に傷害が生じた時に賦活化され、細胞周期停止やアポトーシスを誘導する。p53 が細胞周期停止とアポトーシスをどのように選別しているかは依然解明されていないが、N 末端領域 (アミノ酸 43-63 または 64-92) がアポトーシス誘導に不可欠であることが示唆されている。一方、p53 蛋白にみられるリン酸化やメチル化は、p53 の生理機能の調節に重要である。Ser-15 や Ser-20 のリン酸化により、p53 は活性化されるが、アポトーシスに関連する上記領域にも Ser-46 などリン酸化を受ける候補部位がいくつか検出されている。

p53 の生理機能の大部分は、標的遺伝子の転写活性化を通してもたらされる。すでに多数の p53 標的遺伝子が単離されており、p21^{WAF1} は細胞周期停止に、p53R2 は DNA 修復促進に重要な役割を果たす。アポトーシス誘導に関わる因子としては、*Bax*、*PIG* 遺伝子等いくつかの候補があげられてきたが、単独で発現させた時にアポトーシスを誘導する遺伝子はみつからない。

新規 p53 標的遺伝子単離法として、p53 を外因性に発現させた細胞株を用いる differential display 法と p53 特異的結合配列の単離を目的とした enhancer trap system

法の 2 種類のストラテジーがあげられる。

本研究では、後者の方法より単離した新規 p53 標的遺伝子 *p53AIP1* (p53-regulated Apoptosis Inducing Protein 1) が、p53 依存性アポトーシス誘導に参与することを報告するとともに、p53 の Ser-46 のリン酸化が、*p53AIP1* の転写活性化を調節し、アポトーシス誘導の選択に重要な役割を果たしていることを示す。

〔結果〕

1. p53 結合配列と推測される TCTCTTGCCCGGGCTTGTCG を含む 190bp の DNA 断片が、Yeast enhancer trap system により単離された。コスミドライブラリースクリーニングにより、この配列を含む約 40kb のヒトゲノム DNA が単離され、染色体 11q24 にマップされた。このコスミドの全塩基配列を決定し、コンピュータープログラムにより、エクソン候補領域を同定した。RT-PCR により、新規遺伝子 *p53AIP1* の cDNA 断片が得られた。

Northern blot 解析の結果、0.8kb と 2.7kb の転写産物が、p53 過剰発現により強く発現誘導されたが、正常組織では胸腺以外で発現はみられなかった。cDNA ライブラリーをスクリーニングし、*p53AIP1* の cDNA 全長を単離したところ、選択的スプライシングにより、3つの transcripts (α 、 β 、 γ) が同定された。 α 、 β 、 γ はそれぞれ 124、86、108 アミノ酸をコードしていたが、相同性の高い既知の蛋白はみられなかった。p53 結合配列はイントロン 1 に存在し、ゲルシフトアッセイ、レポーターアッセイにより、p53 がこの配列に結合し、転写を活性化することが証明された。

2. 免疫細胞染色の結果、*p53AIP1* の細胞内局在はミトコンドリアであった。

正常型 p53 を有する NHDF 細胞では、 γ 線照射やアドリアマイシン投与により、内因性の *p53AIP1* の発現誘導が強くみられたが、正常型 p53 を欠失した大腸癌細胞株 SW480 では発現誘導はみられなかった。*p53AIP1* の発現誘導は、*p21^{WAF1}* に比し遅れてみられており、異なる発現誘導機序の存在が考えられた。

TUNEL 法、FACS 解析により、*p53AIP1* を強制発現させた細胞でアポトーシス誘導がみられた。免疫細胞染色により、*p53AIP1* 発現細胞においてミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の低下が確認された。

グリオーマの細胞株 U373MG に、*p53AIP1* のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入すると p53 過剰発現によって誘導されるアポトーシスがほぼ完全に抑制された。

以上より、*p53AIP1* は p53 依存性アポトーシス誘導に不可欠な mediator であることが示唆された。

3. p53 リン酸化部位特異的ポリクローナル抗体 (anti-p-Ser-15, 20 and 46) を用いて、DNA 傷害時の p53 のリン酸化につき検討した。乳癌細胞株 MCF-7 に、紫外線、

γ 線、アドリアマイシンにより DNA 傷害を起こすと、Ser-15、Ser-20 のリン酸化に比べて、Ser-46 のリン酸化は常に遅れて出現した。また、紫外線量を変える実験では、Ser-15、Ser-20 のリン酸化に比べ、Ser-46 のリン酸化は強い線量を必要とした。また、 $p21^{WAF1}$ は弱い線量でも発現が誘導されたが、 $p53AIP1$ は強い線量でのみ発現誘導され、Ser-46 のリン酸化がその発現を制御している可能性が考えられた。

p53 を発現するアデノウィルスベクターを p53 を欠失した肺癌細胞株 H1299 に導入した時も、Ser-46 のリン酸化は Ser-15、Ser-20 より遅れて生じ、 $p53AIP1$ の発現も $p21^{WAF1}$ より遅れて観察された。また、感染濃度を変えた時にも、Ser-46 のリン酸化、 $p53AIP1$ の発現誘導に相関がみられた。

p53 Ser-46 を Ala に変えた mutant (p53S46A) を microinjection 法で導入したところ、コドン 46 のリン酸化もアポトーシス誘導も認められなかった。また、p53S46A 発現ベクター導入によって、標的遺伝子の中で $p53AIP1$ のみ、ほとんど発現が誘導されなかった。ゲルシフトアッセイやレポーターアッセイでも、 $p53AIP1$ の promoter への affinity が著明に低下していた。

〔考察〕

本研究により、 $p53AIP1$ は p53 依存性アポトーシスを mediate する有力な候補遺伝子であることが明らかとなった。ミトコンドリアの膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の低下は、p53 依存性アポトーシスとの関与が知られており、このプロセスに $p53AIP1$ が介在している可能性が考えられる。

p53 蛋白の Ser-46 のリン酸化と p53 依存性アポトーシスとに相関がみられたこと、 $p53AIP1$ の発現誘導が常に $p21^{WAF1}$ より遅れていることより、p53 蛋白の修飾が、標的遺伝子の結合配列への結合能を左右しているのではないかと推測した。実際に Ser-46 の変異によって、 $p53AIP1$ の結合配列に対する結合能の低下が確認された。

今回提唱するモデルは以下のように要約される。DNA に傷害が起こると、初期の段階では p53 の Ser-15、Ser-20 等のリン酸化が起こり、細胞周期を停止させる遺伝子 ($p21^{WAF1}$ 他) や DNA 修復遺伝子 ($p53R2$ 他) 等の発現が誘導される。もし、DNA 損傷が重度で修復不能な時には、その後 Ser-46 がリン酸化を受け、 $p53AIP1$ の発現を誘導し、アポトーシスを引き起こす。

p53 の変異による高次構造の変化が、p53 の DNA 結合能に影響することはこれまでも示唆されているが、今回の実験でも、Ser-121Phe の変異では、 $p53AIP1$ の発現レベルが同等であるのに対し、Mdm2 や $p21^{WAF1}$ の発現レベルは低下することが示された。

p53 の Ser-46 リン酸化のキナーゼとしては、p38MAP kinase は否定的で、別のキナーゼが存在すると考えられる。その同定により、p53 依存性アポトーシスの pathway は

さらに解明されるであろう。

〔実験方法〕

- a. プラスミド ; pCAGGS ベクターを発現ベクターとして使用。
- b. Transfection : lipofectamine 2000 を用いて、発現ベクターを細胞に導入。
- c. 半定量的 RT-PCR ; 細胞より抽出した total RNA より cDNA を合成、15~30 サイクルの条件で PCR を施行。
- d. DNA 傷害の誘導 ; アドリアマイシン(0.2 $\mu\text{g/ml}$ or 3 μM)、 γ 線(14 Gy)、紫外線(~50 J/m^2)を使用。
- e. Microinjection ; p53 発現ベクターを Eppendorf microinjector 及び micromanipulator を用いて細胞の核内に注入。
- f. 細胞免疫染色 ; 固定、ブロッキング、1 次抗体による反応後、2 次抗体として FITC または rhodamine を使用し、発色。
- g. アポトーシスの検出 ; FACS、TUNEL 法、DNA ラダー法にてそれぞれ検出。
- h. Recombinant Adenovirus 及びその感染 ; pAxCAwt コスミドに p53AIP1 α 又は β の cDNA を挿入、293 細胞に感染させ、回収、精製。ウィルス液を、37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 分にてインキュベートし、感染。
- i. Immunoblot 解析と抗体 ; 抽出した蛋白を SDS-PAGE 後、Western blot 法で解析。ラビットを用いて、抗 p53AIP1 及び抗 p-Ser-46 ポリクローナル抗体を作製。
- j. アンチセンスオリゴヌクレオチド ; p53AIP1 の塩基配列をもとに設計し、1 μM を細胞に導入。
- k. EMSA ; p53 を強制発現させた細胞の核抽出液を回収。アニールにより 2 本鎖とし、 ^{32}P 標識した p53 結合配列のオリゴマーと反応させ、4%ポリアクリルアミドゲルにて泳動。

〔まとめ〕

- 1.新規 p53 標的遺伝子 p53AIP1 は、ミトコンドリア膜電位の変位を介して、アポトーシスを誘導する。
2. p53 は Ser-46 のリン酸化によって、アポトーシス誘導を調節しており、Ser-46 のリン酸化は p53AIP1 を含む特定のアポトーシス関連遺伝子の転写活性化に重要である。

3998 字