

論文の内容の要旨

論文題目 9-ヒドロキシエリプチシンの作用機作に関する研究

氏名 杉川 恵美子

9-ヒドロキシエリプチシン (9HE) は、*Ochrosia acuminata* および *Ochrosia elliptica* 由来の植物アルカロイドとして知られるエリプチシンの誘導体である (図1)。エリプチシン誘導体は強い殺細胞作用を有することが知られており、トポイソメラーゼ II (トポ II) 阻害作用が、その作用機作であると報告されている。しかし、我々は、9HE の殺細胞作用は、トポイソメラーゼ II 阻害以外の経路が大きく寄与するのではないかと考え、トポ II 阻害以外の殺細胞作用機作について検討を進めた。その結果、エリプチシンおよび 9HE が Cdks キナーゼ、カゼインキナーゼ II (CKII) 等のプロテインキナーゼを阻害することを新たに見出した。一方、他のエリプチシン誘導体、エリプチニウムアセテート (EA) では、CKII を阻害するものの、Cdks 阻害作用はみられなかった (表1)。

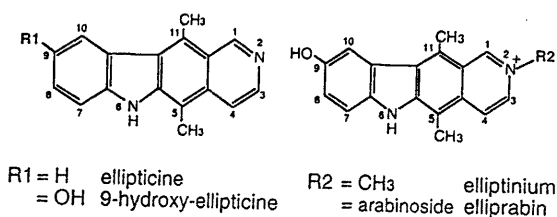


図1 エリプチシン誘導体の構造
エリプチシン誘導体は強い殺細胞作用を持ち、トポイソメラーゼ II 阻害作用が、その作用機作であると報告されている。

表1 エリプチシン誘導体によるプロテインキナーゼ阻害作用

Drug	IC ₅₀ (μM)				
	Cdc2	Cdk2	CKII	PKA	PKC
Ellipticine	9.3	3.4	0.65	140	12
9HE	0.30	0.58	0.10	73	40
EA	380	26	0.16	48	>500

各プロテインキナーゼの基質ペプチドについて、[γ-³²P] ATP 存在下薬剤にて5分間反応を行い、反応液を12% SDS-PAGE に供し、基質のリン酸化をイメージアナライザーにて定量した。

そこで次に 9HE によってリン酸化が阻害されるタンパク質を明らかにするために、マウス由来ルイス肺癌細胞のマイクロソーム画分を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下 9HE で処理した。その結果、53 kDa 付近のタンパク質のリン酸化が著しく阻害された。そのタンパク質は、9HE によって阻害される Cdks の基質の一つであることと、そのサイズが 53kDa であることより、p53 であると予想した。上記のリン酸化ラベルした反応液について抗 p53 抗体を用いた免疫沈降反応を行い、9HE によってリン酸化が阻害されるタンパク質の一つが p53 であることを確認した。

ガン抑制遺伝子 p53 は、転写活性化因子として働くことにより、UV 等で細胞内の遺伝子がダメージを受けた際の細胞周期の停止、遺伝子修復、および修復不能な遺伝子の異常を次世代に伝えないためのアポトーシス誘導などの役割を担う。p53 遺伝子は、ガンにおいて非常に高頻度に変異を有し、その機能を失う。p53 はまたリン酸化蛋白であり、DNA 損傷時等に活性化される DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK)、チェックポイントキナーゼ (Chk1)、Cds1 (Chk2) あるいは JNK (c-Jun N-terminal kinase) によりリン酸化を受ける。これらのキナーゼによるリン酸化は、p53 と、p53 のネガティブレギュレーターである MDM2 タンパクの結合を阻害することで、MDM2 による p53 の分解を妨げ、p53 を安定化し活性化する。野生型 p53 のリン酸化は、p53 の活性化や安定性などに寄与すると考えられるが、機能を失った変異型 p53 においてリン酸化がどのような意義を持つのかは明らかではない。

野生型 p53 は、転写活性化因子として、Cdk インヒビターである p21waf-1 やアポトーシスメディエーター bax 遺伝子を誘導し、細胞を G1 期停止、アポトーシスに導くが、変異型 p53 ではこれらの転写活性化能や DNA 結合能は失われる。上述の実験に用いたルイス肺癌細胞の p53 は変異型である。9HE が変異型 p53 のリン酸化を阻害したことから、9HE は変異型 p53 リン酸化の阻害を介して変異型 p53 の機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、9HE が、変異型 p53 の DNA 結合能に及ぼす効果を検討した。変異型 p53 を有するヒト乳癌細胞 SK-BR-3 および野生型 p53 を有するヒト大腸癌細胞 HCT116 をそれぞれ 9HE で処理して核抽出液を得、野生型 p53 に特異的に結合するコンセンサス配列 (BC 配列) を用いてゲルシフトアッセイを行った (図 3)。野生型 p53 は 9HE の有無に関係なく DNA 結合能を持つのに対し、変異型 p53 は DNA 結合能を失っていたが、9HE で処理した変異型 p53 は、再び DNA 結合能を持った。

p53 遺伝子の変異は、その中央部に集中しており、この部分は p53 のコンフォメーションに関与することが明らかとなっている。9HE は、変異によって大きく変化した p53

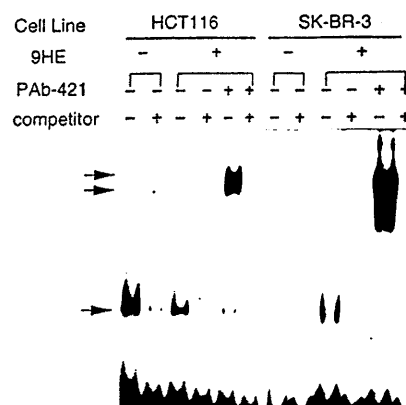


図2 p53 の DNA 結合能に及ぼす 9HE の効果
野生型 p53 を有するヒト大腸癌細胞株 HCT116 および変異型 p53 を有するヒト乳癌細胞株 SK-BR-3 を無処理または 9HE (10 μ M) にて 16 時間処理し、得た核抽出液について、野生型 p53 特異的配列 BC 配列を用い、抗 p53 抗体 (PAb-421) 存在下あるいは非存在下、ゲルシフトアッセイを行った。

のコンフォーメーションに影響を及ぼして、再び野生型に近いコンフォーメーションに変化させる可能性が考えられた。そこで、9 HE が変異型 p53 の三次元構造に及ぼす影響を、カルパイン感受性を指標として検討した。p53 は、N 末と C 末側にそれぞれカルパイン切断部位を持つ。野生型 p53 はカルパインにより容易に切断されるが、変異型 p53 のうちコンフォーメーションが大きく変わるタイプでは、カルパイン消化に抵抗性になることが報告され、カルパイン感受性が、p53 のコンフォーメーションの状態を表す 1 つの指標になると考えられる。カルパインに抵抗性を持つ変異型 p53(Arg175His) を有する SK-BR-3 細胞を 9 HE 処理して細胞抽出液を得、これをカルパインで処理し、抗 p53 抗体を用いた免疫ブロッティングにより p53 を検出した。その結果 9HE 処理した変異型 p53 は、カルパインで速やかに消失した。9 HE は変異型 p53 の DNA 結合能を回復させるが、これにコンフォーメーション変化が関与することが示唆された。

9 HE は、Cdk キナーゼ等のプロテインキナーゼを阻害することから、9 HE による変異型 p53 リン酸化阻害が、変異型 p53 の構造変化に寄与して DNA 結合能を回復させ、アポトーシスを誘導すると考えられた。これを確かめるために、変異型 p53 のリン酸化部位セリンにポイントミューテーションを導入してアラニンに変換したリン酸化部位変異体を作製し、変異型 p53 のリン酸化阻害が、そのコンフォーメーションや DNA 結合能に及ぼす影響を検討した(図 4)。

9 HE が阻害するプロテインキナーゼのうち、p53 を基質としうる DNA-PK, Cdks あるいは CKII のリン酸化部位に変異を導入した変異型 p53 のリン酸化部位変異体を作製した。これらについてバキュロウィルスの発現系を用いてそれぞれのタンパクを調製し、野生型 p53 特異的 DNA 結合配列への結合能およびカルパイン感受性を検討した。もとの変異型 p53 は、DNA 結合能を持たず、カルパイン消化に対して抵抗性であるのに対して、DNA-PK および Cdks リン酸化部位に変異を導入した変異型 p53 リン酸化部位変異体では、DNA 結合能を持ち、カルパインにより速やかに分解された。

更にこれらのリン酸化部位変異体、もとの変異型 p53 および野生型 p53 をそれぞれネオマイシン耐性遺伝子を含む発現ベクターにクローニングしたのち、p53 欠損細胞株である Saos-2 細胞に発現させ、ネオマイシン存在下で 2 週間培養してコロニー形成能を調べた。

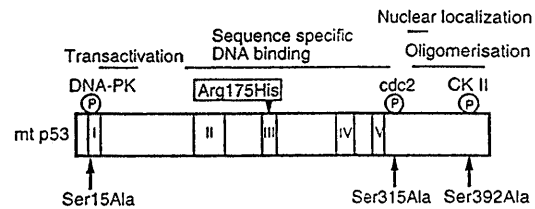


図3 実験に用いた変異型 p53 リン酸化部位変異体
変異型 p53(Arg175His)について、DNA-PK リン酸化部位
変異体 (Ser15Ala, Arg175His)、Cdk リン酸化部位変異体
(Ser315Ala, Arg175His)、CKII リン酸化部位変異体
(Ser392Ala, Arg175His) を作製した。

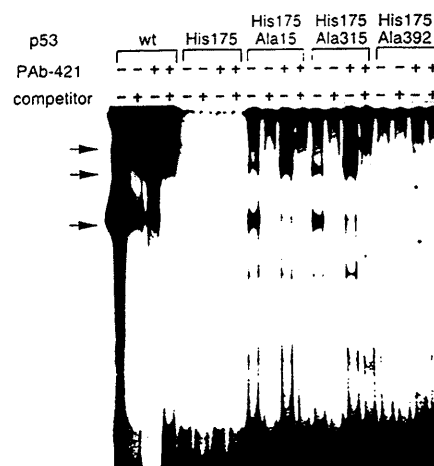


図4 変異型 p53 および各リン酸化部位変異体の DNA 結合能
各種 p53 タンパク質をバキュロウィルスの発現系にて調製し、野生型
p53 特異的配列 BC 配列を用いてゲルシフトアッセイを行った。

増殖抑制能を持つ野生型 p53 トランスフェクタントでは、ごく少数のコロニーが観察されたのみであった。一方もとの変異型 p53 と、その CKII リン酸化部位変異体では著しい数のコロニーが形成された。これに対して変異型 p53 の DNA-PK および Cdk5 リン酸化部位変異体ではコロニー数が著しく減少しており、増殖抑制がみられた。更に、これらのリン酸化部位変異体を一過性に発現させた Saos-2 細胞について、p53 を FITC 標識した抗 p53 抗体で、DNA をプロピジオジウムイオダイドにより染色し、フローサイトメトリーにて p53 発現細胞の細胞周期を解析したところ、野生型 p53 のトランスフェクタントと同様に、アポトーシスの誘導が観察された。これらの結果は、転写活性化能、DNA 結合能が失われた変異型 p53 は、そのリン酸化が阻害されることにより、コンフォーメーション変化を伴い、DNA 結合能を回復し、増殖抑制能やアポトーシス誘導能をもたらすことを強く示唆する。

以上の結果から、9HE の新たな作用機作として、9HE が変異型 p53 の Cdk5 あるいは DNA-PK リン酸化部位のリン酸化を阻害することによって変異型 p53 の DNA 結合能を回復させ、アポトーシスメディエーター bax の発現を上昇させてアポトーシスを誘導する経路が示唆された(図 5)。

野生型 p53 においては、DNA-PK や JNK によるリン酸化が、野生型 p53 と MDM2 タンパクとの結合を阻害して p53 を安定化、活性化する。しかし、変異型 p53 は野生型のコンフォーメーションを保持しておらず、MDM2 に結合しない状態で既に転写活性化能を失っている。変異型

p53 において、リン酸化による MDM2 との相互作用は転写活性化能に重要な寄与をせず、変異型 p53 の再活性化は、本論で示したような別の機構を介することが示唆された。Cdk2 や DNA-PK リン酸化の阻害が、変異型 p53 の機能を回復させる詳細な機構は不明であるが、変異型 p53 の 3 次元構造の変化が、DNA との相互作用やオリゴメリゼーションの回復に寄与すると考えている。本論は、薬剤が変異型 p53 の機能を野生型へ回復させることを示唆した初めての知見である。

正常組織では、野生型 p53 はほとんど発現していないが、変異型 p53 は大腸癌、肺癌等の癌において高発現していることから、変異型 p53 におけるリン酸化の阻害は、癌細胞に選択的かつ効果的にアポトーシスを誘導すると考えられる。本作用機作は、制癌剤の新たなターゲットとしても有望であると考えられた。

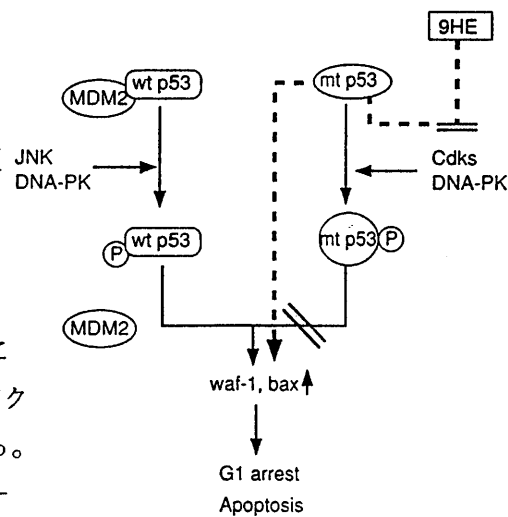


図5 9HEの作用機作