

審査の結果の要旨

氏名 杉川 恵美子

ガン抑制遺伝子p53は、UV等で遺伝子が損傷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果たす転写活性化因子である。p53はガンにおいて高頻度に変異が認められ、その機能を失う。野生型p53は、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）をはじめとする数種類のプロテインキナーゼによってリン酸化され、転写の活性化などに寄与すると考えられているが、機能を失った変異型p53においては、リン酸化がどのような意義をもつのかは不明である。

植物アルカロイドのエリプチン誘導體である9-ヒドロキシエリプチシン（9HE）は強い殺細胞作用を有し、トポイソメラーゼII（トポII）阻害がその作用機作であると報告されていた。しかし、トポII阻害剤によるアポトーシスはG2/M期への停止を伴うのに対して、9HEによるアポトーシスはG1期の細胞に起こること、さらに9HEが細胞周期依存性キナーゼ（Cdk2）を阻害することが本研究によって明らかにされ、9HEによるアポトーシスがトポII阻害剤と異なることが示された。9HEは癌細胞株において変異型p53のリン酸化を強く阻害したことから、本研究では、9HEのアポトーシス誘導に関わる変異型p53の寄与について検討し、9HEの新たなアポトーシス誘導機構を明らかにしている。

1. 9HEによるアポトーシス誘導機構

9HEによって誘導されるアポトーシスに、変異型p53が寄与する可能性を検討するために、変異型p53を発現させた細胞株を作製し、9HEに対する殺細胞作用の感受性を親株と比較検討した。その結果、変異型p53発現細胞においてはその感受性が有意に増加し、さらに9HEに対する感受性は、発現させた変異型p53の蛋白質レベルにほぼ依存した。すなわち、9HEは変異型p53を介してアポトーシスを誘導することが示された。

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期に停止させて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結合能が失われる。9HEが変異型p53のDNA結合能に与える効果を検討した結果、9HEで処理した変異型p53はDNA結合能を回復し、bax遺伝子の発現を誘導することが明らかとなった。これは、9HEが変異型p53の転写活性化能を回復させて、アポトーシスを誘導したことを示唆する。

2. リン酸化部位に点変異を導入した変異型p53の性状解析

9 HEはCdk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のリン酸化阻害が変異型p53に構造変化をもたらし、DNA結合能を回復させてアポトーシスを誘導する可能性が考えられた。そこで、変異型p53のリン酸化部位であるセリンをアラニンに置換した点変異導入体を作製し、変異型p53のリン酸化阻害がその構造変化やDNA結合能に与える影響を検討した。

DNA-PK, Cdksあるいはカゼインキナーゼ (CK) II のリン酸化部位に変異を導入した変異型p53の各種リン酸化部位変異体について、野生型p53に特異的なDNA結合配列への結合能を検討した。その結果、DNA結合能をもたない変異型p53は、DNA-PKおよびCdkリン酸化部位への変異の導入によって、DNA結合能をもつようになることが明らかとなった。さらに、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p53欠損細胞株に発現させ、コロニー形成能を検討した。その結果、変異型p53では多数のコロニーが形成されたが、DNA-PKおよびCdkリン酸化部位に変異を導入した変異型p53ではコロニー数が著しく減少し、強い増殖抑制が観察された。さらに、これらのリン酸化部位変異体を一過性に発現させてその細胞周期を解析したところ、アポトーシスの誘導が観察された。これらの結果から、転写活性化能及びDNA結合能が失われた変異型p53においては、そのリン酸化を阻害すると、構造変化によって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が明らかにされた。

以上を要するに本論文は、9HEが、変異型p53のCdk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であるbaxの発現を上昇させるという、新しいアポトーシス誘導経路を示したものであり、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の発現量は非常に低く、癌組織において変異型p53が高発現していることから、変異型p53リン酸化の阻害によって、癌細胞に選択的かつ効果的なアポトーシスの誘導が期待される。本論文の研究成果は、癌化学療法剤の開発を進める上で重要な知見を与えるものであり、博士(薬学)の学位として十分な価値があるものと認められる。