

論文の内容の要旨

論文題目 p53 によるクラスリンを介したエンドサイトーシス制御機構の解析

指導教員 澁谷 正史 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 遠藤 克枝

1 序論

p53 はヒトの癌の約 50%で変異による機能欠損が見つかっており、ほぼ 100%の癌で p53 を介した経路の異常が見出されることから、最も重要な癌抑制遺伝子であると考えられている。p53 は転写因子であり、DNA 損傷や癌遺伝子の異常な活性化により、核内で安定化・活性化され、細胞周期停止やアポトーシスに関与する遺伝子の発現を誘導することで、癌の抑制に寄与している。しかし、p53 は転写因子としての機能以外にも、これまで予想もされなかった多彩な機能を持つことが知られてきており、例えば、p53 はミトコンドリアに局在し、転写非依存的にアポトーシスを誘導したり、細胞分裂期には p53 が中心体に局在し、中心体の正常な複製に重要な役割を果たしている。このように、p53 はさまざまな機能を駆使して、癌の抑制に寄与していることが推察される。最近、エンドサイトーシスの制御に関わるクラスリン重鎖 (CHC) が、一部核内にも存在して p53 と直接結合し、p53 による転写活性化に必須の役割を果たしていることが報告された。以前より、エンドサイトーシスの異常と癌化の関連性が報告されていたが、現在までにどのような分子機構によるものか、その詳細は明らかにされていない。大部分のクラスリンは細胞質に局在し、エンドサイトーシスを制御していること、細胞質にも p53 が存在することから、p53 は細胞質においても CHC と結合し、エンドサイトーシスの制御を介して、癌の抑制にはたらいている可能性が考えられた。そこで本研究では、p53 が細胞質の特に細胞膜近傍でエンドサイトーシスを制御する可能性について検討を行った。

2 細胞質における p53 とクラスリンに関する解析

細胞質において p53 が CHC と結合するかを確かめるために、p53 欠損細胞株 H1299 に p53 を遺伝子導入し、細胞質画分と核画分を抽出した。各画分を抗 CHC 抗体で免疫沈降し、ウェスタンブロッティングにより、p53 が共沈殿してくるかを調べた。その結果、これまでの報告通り、核画分で p53 と CHC の結合が見出されたが、細胞質画分においても両者の結合が検出できた。細胞質画分における p53 と CHC との結合は内在性の野生型 p53 を持つ乳癌細胞株 MCF7、正常線維芽細胞 TIG-7 でも確認できた (図 1)。

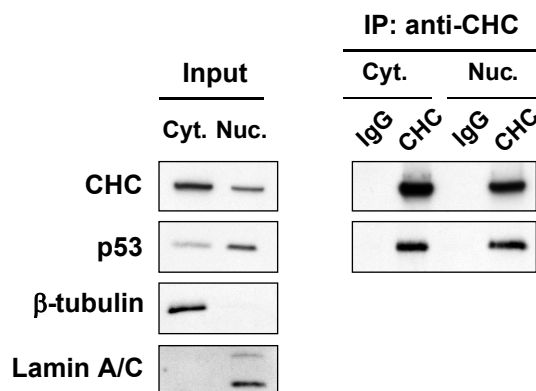


図1 p53は細胞質でもCHCと結合する

p53 の細胞内局在を細胞免疫染色法により解析したところ、TIG-7 細胞において、p53 は主に核に局在していたが、細胞質への局在も観察された。そして、一部の細胞では、p53 が細胞膜近傍に局在していることがわかった。さらに、p53 と CHC の二重染色をおこなったところ、細胞膜近傍で p53 と CHC は共局在していることが示された。次に、エンドサイトーシスを誘発する刺激を細胞に与えたときの p53 の局在がどのように変化するかを観察した。細胞を血清除去

処理した後、上皮増殖因子 (EGF) を細胞に添加し、氷上で 1 時間刺激すると、驚くべきことに、細胞質の p53 が細胞膜近傍に集積してくることがわかった。そして、細胞膜近傍に集積した p53 は CHC と共局在していることが示された (図 2)。さらに、蛍光標識した EGF を細胞に添加し、氷上で 1 時間刺激した時に、p53 は細胞膜近傍で蛍光標識された EGF と共局在することが示された。こ

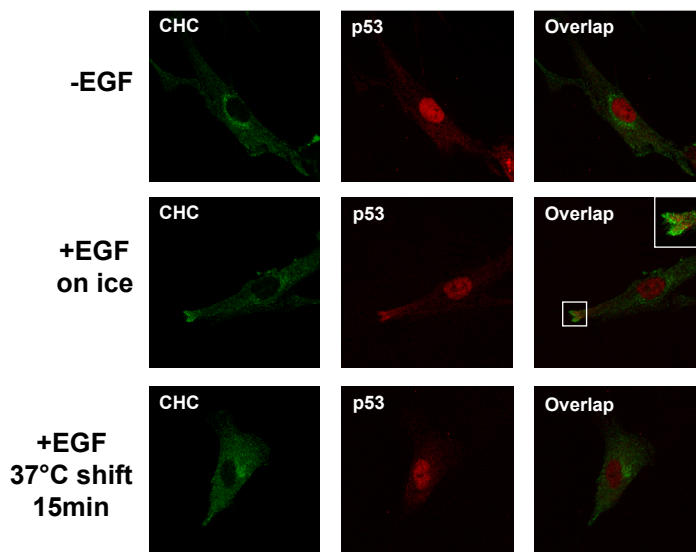


図2 p53はEGF刺激によって細胞膜近傍に局在する

このことから、p53 は EGF 刺激によって、

細胞膜近傍の、特にエンドサイトーシスがまさに起ころうとしている場所に集積してくることが明らかとなった。以上の結果から、p53 は細胞膜近傍でクラスリンを介したエンドサイトーシスの制御に関与している可能性が示唆された。

3 p53 によるクラスリンを介したエンドサイトーシス調節機構の解析

p53 がエンドサイトーシスに及ぼす影響を調べるため、p53 の発現を RNA 干渉法を用いて抑制し、EGF の細胞内への取り込みがどのように変化するかを検討した。正常線維芽細胞 TIG-7、野生型 p53

を持つ肺非小細胞癌細胞株 A549 を用いて、内在性の p53 をノックダウンし、¹²⁵I 標識された EGF (¹²⁵I-EGF) の細胞内への取り込み実験を行った。その結果、p53 をノックダウンした細胞ではコントロール細胞に比べて、¹²⁵I-EGF の細胞内への取り込みが減弱した (図 3a)。

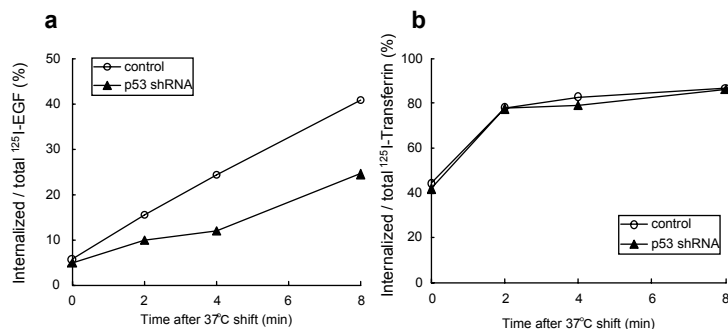


図3 p53ノックダウン時にEGFの取り込みは減弱する

一方、細胞内へのシグナル伝達機能を持たないトランスフェリンのエンドサイトーシスは、p53 をノックダウンしても変化がなかった (図 3b)。このことは、p53 が増殖シグナルを伝達する EGF のエンドサイトーシスを特異的に制御している可能性を示唆している。

通常、増殖シグナルを伝達する受容体は細胞内にシグナルを伝達した後、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、リソソームに運ばれて分解される。このエンドサイトーシスによる増殖シグナルの下方制御が細胞の正常な増殖に重要であると考えられている。p53 をノックダウンした細胞では EGF の細胞内への取り込みが減弱したことから、この細胞では、EGF 受容体 (EGFR) からの増殖シグナルの下方制御が行われず、シグナル伝達

が増強していることが推測された。そこで、p53 をノックダウンした細胞で EGFR の下流のシグナル伝達系に関わる分子の活性化状態を解析した。EGF 刺激した細胞の全抽出液を SDS-PAGE にかき、EGFR 下流の主要なシグナル伝達分子に対する抗体でウェスタンブロッティングを行った。活性化状態を示す各種抗リン酸化抗体を用いた結果、p53 をノックダウンした細胞で、PI3 キナーゼの下流で活性化される Akt や EGF 依存的な増殖に必須である JNK の活性が顕著に増加していることがわかった (図 4)。このとき MAP キナーゼ (ERK) の活性には変化がなかった。正常な細胞増殖には細胞外からの増殖シグナルがある決まった順序と強度で細胞内に伝えられることが重要であり、これらが乱れることで異常な細胞増殖や癌化がおこる。よって、p53 は EGFR のエンドサイトーシスを制御することで、異常な細胞増殖の抑制に寄与している可能性が示唆された。

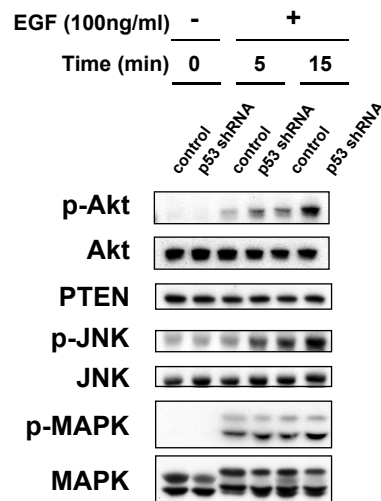


図4 p53ノックダウン時にEGFR下流のシグナル伝達異常がみられる

前述の結果から、p53 は細胞膜近傍で CHC や蛍光標識された EGF と共局在していたことより、p53 が EGFR を含むクラスリン被覆小胞に結合する可能性を検討した。ビオチン標識された EGF で細胞を刺激し、細胞抽出液から、アビジンを架橋した磁気ビーズを用いてビオチン標識された EGF と EGFR 複合体を精製したところ、EGF 刺激依存的に p53 が EGFR 複合体に含まれてくることが示

された。このことから、p53 は細胞膜近傍で EGFR 複合体を含む小胞輸送の段階でエンドサイトーシスに参与している可能性が示唆された。さらに p53 の局在を詳細に調べるため、免疫電子顕微鏡法を用いて解析した。TIG-7 細胞を EGF 刺激した後、抗 p53 抗体で染色した結果、予想外にも p53 はアクチン繊維 (F-アクチン) に局在することがわかった。そして、p53 は EGF 刺激がない状態では、ほとんど F-アクチンへの局在は見られないのに対し、EGF

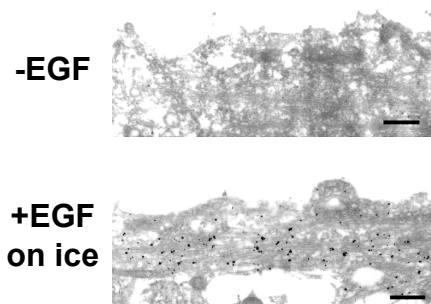


図5 p53はEGF刺激依存的にF-アクチンに局在する

刺激によって細胞膜近傍の F-アクチンへの局在が顕著に増加することも示された (図 5)。さらに、前述のビオチン EGF を用いた EGFR 複合体精製実験において、EGF 刺激依存的に p53 だけでなく、アクチンも EGFR 複合体と共に精製されてきた。アクチンの再構築系は細胞運動の制御だけでなく、エンドサイトーシスにおいて、被覆小胞の細胞内への取り込み時に重要な役割を果たしている。これらの結果から、p53 は EGF 刺激依存的に細胞膜近傍の F-アクチンに集積し、アクチンの再構築系に何らかの影響を及ぼすことで、クラスリンを介したエンドサイトーシスを制御していることが示唆された。

4 結論

本研究では、エンドサイトーシスの過程において癌抑制タンパク質 p53 が関与していることを初めて示した。一連の実験結果から、p53 が EGF 刺激によって、細胞膜近傍に集積し、EGF の細胞内への取り込みを制御することで細胞増殖に関与していることが明らかになった。さらに、p53 が EGF 刺激依存的に細胞膜近傍の F-アクチンに局在していることを示し、アクチンの再構築系の制御を介してエンドサイトーシスを調節している可能性を示した。これらの結果は、p53 が転写因子であることから、p53 による転写によって誘導された標的遺伝子産物がエンドサイトーシスを制御している可能性も少なからずあることは否めない。よって、今後は転写のおこらない無細胞系を用いて p53 がエンドサイトーシスのどのステップを制御しているのかについて、さらなる研究が望まれる。しかし、p53 が EGF 刺激依存的に細胞膜近傍に集積してクラスリンと共局在し、細胞膜近傍の F-アクチンにも局在することや、EGF 刺激により EGFR 複合体との結合が検出されたことから、少なくとも p53 は細胞膜近傍で直接的にクラスリンを介したエンドサイトーシスを制御している可能性が高いと考えられる。現在実用化されている医薬品の多くが細胞膜受容体やチャネルを標的として開発されていることや、エンドサイトーシスが様々な生命現象を制御していることを考慮すると、p53 によるエンドサイトーシスの制御機構の解明は、依然として謎の多い癌の原因解明に寄与するものと思われる。