

論文の内容の要旨

論文題目 Tumor suppressor p53 is required for anchorage loss-invoked degradation
of Cdc6 and cyclin A

和訳 足場非存在下における Cdc6 タンパクと cyclin A の分解に関する
がん抑制遺伝子 p53 の必要性

指導教員 矢富 裕 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

内科学専攻

小林 公平

はじめに

がん抑制タンパク質 p53 はヒトのがんで広く変異が認められており、アポトーシス誘導機能とチェックポイント機能を通して強い腫瘍抑制機能を発揮することは知られているが、その詳細についてはいまだ明らかではない。

腫瘍形成能を哺乳動物培養細胞で調べる方法として軟寒天培地中のコロニー形成能、いわゆる足場非依存性増殖能をみる方法が古くから用いられており、これはがん化の指標のみならず、転移・浸潤の指標にもなることが知られている。血球系細胞以外の体細胞由来の培養細胞では足場消失時に G1/S 期境界に停止することは広く知られており、これはサイクリン依存性キナーゼ Cdk2 の不活化や S 期開始必須因子の発現消失や機能低下によって起こることが明らかになってきた。

本研究ではこの足場非依存性増殖能を指標にして p53 がどのようにがん抑制機能を発揮するかについて明らかにすることを目的とする。

足場非存在下での Cdc6 タンパクと cyclin A の分解は p53 に依存する

細胞内で DNA 障害が生ずると p53 が活性化され、それによりサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパクの 1 つである p21 が誘導され、その結果 G1 期や S 期に停止することは広く知られているが、p21 ノックアウトマウス由来胎仔繊維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast) の p21^{-/-}MEF でもストレス誘導で G1 期に停止する点や p53 の失活で足場非依存性増殖を起こしやすくなる点などから、p53^{-/-}MEF では足場消失時に S 期開始必須因子の発現レベルに影響が出る可能性を考えた。以前 NRK 細胞では足場非依存下で S 期開始必須因子の一つである Cdc6 タンパクの分解が促進されることは神野らにより示されていることから、タンパク分解機構に焦点を絞るため、細胞周期によらず恒常的に Cdc6 mRNA が発現する p53^{-/-}MEF をレトロウイルスベクターを用いて作製し以後の実験を行った。コントロールの細胞として MEF を当初用いる計画であったが、MEF の増殖速度が非常に遅い点、Cdc6 の組換えレトロウイルスのタイターが非常に低い点などから MEF で Cdc6 発現細胞を作製することが困難であった。p27 と p53 の直接の関連は今まで報告はなく、p27^{-/-}MEF の増殖速度は p53^{-/-}MEF と同程度でありコントロールとして用いても差し障りないと判断し、p27^{-/-}MEF を用いることにした。対数増殖期の細胞をメチルセルロース入り培地に浮遊させ、所定の時間培養後、細胞を回収しウェスタンブロットで様々な S 期開始必須タンパクの発現を調べた。その結果、p53^{-/-}MEF では Cdc6 タンパクの発現が 48 時間まで持続するのに対し、コントロール細胞の p27^{-/-}MEF では速やかに Cdc6 タンパクの発現が低下することが確認できた。その他、内因性の cyclin A についても同様の結果が得られた。また、サイトメトリー解析では浮遊条件下 48 時間後の細胞は G1 期に停止しており、p53^{-/-}MEF が浮遊条件下では G1 期に停止しているにも関わらず Cdc6 タンパクの発現が持続していることが確認できた。次に、足場消失時に p53 の誘導が生じるかを確認してみると、p53 はわずかに誘導されており、それに対し p21 の発現は全く認められなかった。次に浮遊下での Cdc6 恒常発現 p53^{-/-}MEF にアデノウイルスベクターを用いて p53 を発現させると、Cdc6、cyclin A の発現レベルの低下が認められた。以上から浮遊条件下での Cdc6 や cyclin A の分解に p53 が関与していることが示唆された。

足場消失時の Cdc6 タンパクと Cyclin A の分解には主にプロテアソーム系が関与している

足場消失時の Cdc6 タンパク分解がどの系で行われているかを調べるために、Cdc6 を恒常的に発現させた p27^{-/-}MEF と各種プロテアーゼ阻害剤を用いて分解を抑制させる実験を行った。対数増殖期の細胞をメチルセルロース入り培地に 24 時間浮遊させた後、プロテアーゼ阻害剤を添加し、さらに 12 あるいは 24 時間培養し、細胞を回収した。その結果 Cdc6 タンパクの分解が抑制されたものは、AEBSF と高濃度 ALLN (50 μM) であった。ただし、高濃

度 ALLN で 24 時間培養すると 12 時間培養で出現した full size (62kDa) の Cdc6 は消失し、47kDa と 34kDa の断片が認められるようになった。cyclin A についても AEBSF と高濃度 ALLN の添加後 12 時間で full size が現れ、24 時間では消失した。一方、p53^{-/-}MEF でのこれら阻害剤の効果は Cdc6 に対してはわずかであり、cyclin A ではほとんど効果が認められないことから、AEBSF や高濃度 ALLN で阻害を受けかつ Cdc6 や cyclin A を分解しうるプロテアーゼの活性は p53^{-/-}MEF では弱いことが示唆された。

次にその分解系をより明らかにするために以下の実験を行った。AEBSF はセリンプロテアーゼ阻害剤であり、ALLN はシステインプロテアーゼやプロテアソームの阻害剤であることから、最初、両者の酵素によって分解が起こると考えた。そこで浮遊下 G1 期に停止させた p27^{-/-}MEF から調整した細胞抽出液にウサギ網状赤血球細胞抽出液中で合成した Cdc6 タンパクとプロテアーゼ阻害剤を加えてタンパク分解の抑制実験を行ったが、細胞抽出液中には Cdc6 タンパクを分解するセリンプロテアーゼ活性は認められず、浮遊下 NRK 細胞で認められるのと同様のシステインプロテアーゼ活性のみを認めた。そこで、AEBSF は NADPH oxidase の阻害作用があり、また oxygen radical はユビキチン化せずにタンパクを分解するという報告もあるため、Cdc6 分解への NADPH oxidase の関与も考慮し、oxygen radical scavenger である Tiron と NADPH oxidase の阻害剤である apocynin を用いて、浮遊条件下の Cdc6 恒常発現 p27^{-/-}MEF への効果を検討したが Cdc6 タンパクや cyclin A の分解抑制効果はほとんど認められなかった。

AEBSF の標的は何であるか、システインプロテアーゼとプロテアソームどちらが Cdc6 と cyclin A の分解に関わっているのか、ALLN を加えて 24 時間後にどうして Cdc6 の 47 kDa と 34 kDa の断片が生ずるのかを明らかにするために、AEBSF、ALLN、lactacystin、z-VAD-fmk を同時に加えてその効果を調べた。ALLN はシステインプロテアーゼとプロテアソームの両方に阻害作用を持つのに対し、lactacystin はプロテアソームの特異的阻害剤であることから両者の効果を比較してみた。すると p27^{-/-}MEF と p53^{-/-}MEF で効果の差はほとんど認められなかったことから、Cdc6 分解にはシステインプロテアーゼではなくプロテアソームが主に関与していることが示唆された。次に、ALLN や lactacystin で生ずる Cdc6 の 47 kDa と 34 kDa の断片はカスパーゼ阻害剤の z-VAD-fmk で抑制されることから、プロテアソームを阻害した結果 caspase-3 が活性化し Cdc6 タンパクを分解し 47 kDa と 34 kDa の断片が生じたことがわかった。

以上から浮遊条件下で Cdc6 や cyclin A の分解にはプロテアソーム系が関与していることが示された。現在までのところ AEBSF はそのプロテアソーム系を阻害するものと考えられた。

足場消失時のカテプシン L 様活性は p27^{-/-}MEF の細胞質中では認められるが p53^{-/-}MEF で

は認められない

NRK 細胞では足場消失時の Cdc6 タンパク分解はカテプシンで生じ、カテプシン L 様活性がその細胞質中で上昇していることがわかっている。それに対して MEF での Cdc6 タンパク分解はシステインプロテアーゼであるカテプシンの関与は小さく、プロテアソーム系で主に分解されることを示したが、MEF でも足場消失時のカテプシンの活性が細胞質中で上昇しているか調べた。その結果、足場消失時の MEF や p27^{-/-}MEF では NRK 細胞と同様、カテプシン L 様活性の上昇が認められたのに対し、p53^{-/-}MEF では認められなかった。カテプシン B 様活性は足場消失時に p27^{-/-}MEF でも p53^{-/-}MEF でも上昇することから、カテプシン L 様活性の上昇には p53 が必要であることが示唆される。

足場消失時の cdc6 遺伝子の転写抑制には p53 は関与していない

足場消失時には cdc6 と cyclin A のプロモーターが Cdk4 と Cdk6 の不活化により遮断されることがわかっているが、p53 が足場消失時の cdc6 と cyclin A 遺伝子抑制に関与しているか mRNA レベルで調べてみると、p27^{-/-}MEF と p53^{-/-}MEF に差はあまりなく p53 は関与していないことがわかった。

p53^{R172P} は足場消失時に Cdc6 と cyclin A の不安定化能をもつ

p53^{R172P} は p53 の 172 番アルギニンがプロリンに置換された変異体で、この変異体を持ったマウス由来の細胞はアポトーシスの機能が失われているがチェックポイント機能はあり、その変異体のノックインマウスは腫瘍抑制機能を保持していることが知られている。そこで、この細胞を用いて足場消失時の Cdc6 タンパクと cyclin A の発現を調べると両者タンパクは同様に速やかに分解された。これに AEBSF や高濃度 ALLN を加えると分解が抑制され、細胞質中のカテプシン L 様活性も上昇していた。このことから、p53^{R172P} を持ったマウスが p53 ノックアウトマウスとは異なり腫瘍抑制能を保持しているのは足場消失時の Cdc6 タンパクの分解能を有していることが原因の可能性が示唆された。

まとめ

MEF が足場を消失した場合、Cdc6 タンパクと cyclin A が分解される。この分解系は p53 に依存的であり、AEBSF 感受性のユビキチン/プロテアソーム系の可能性が示唆された。p53 の腫瘍抑制能はアポトーシス誘導機能によるだけでなく、足場消失時の Cdc6 タンパクや cyclin A の分解作用を通して発揮していることが示唆された。