

# 論文内容の要旨

論文題目      がん抑制蛋白質 p53 依存性転写におけるクラスリン重鎖の機能解析

氏 名

大 森      一 二

## 1、研究の背景

p53 遺伝子には、人のがんで約 50%に変異が認められるもっとも重要ながん抑制遺伝子である。正常な細胞では p53 蛋白質は MDM2 蛋白質によりユビキチン化を受け、ユビキチン・プロテアソーム系により分解を受けて不活性化されている。しかし、細胞にがん遺伝子の活性化や、DNA 損傷刺激などのストレスが生じると、p53 はリン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾を受け、MDM2 による抑制が解除され p53 の蓄積・活性化がおきる。活性化された p53 は核内で転写因子として機能し、細胞周期停止やアポトーシス誘導に関わる因子を誘導し細胞増殖を停止させ、あるいは死に至らしめる。このようにして、p53 は異常な細胞を下流遺伝子の転写を介して排除することによりがんを抑制している (図 1)。

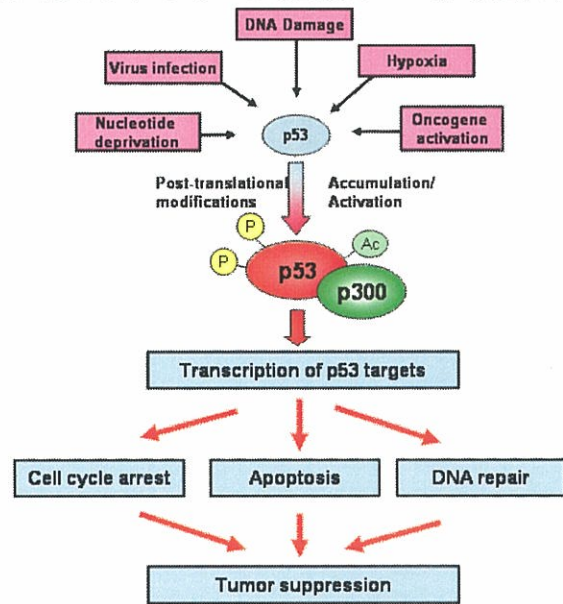


図1 p53によるがん抑制機構  
p53によるがん抑制はp53による標的遺伝子の転写を介しておこなわれる。

p53 による転写を媒介するコファクターとして、p300 ヒストンアセチル化酵素が必須の役割を果たしている。活性化した p53 は p300 と結合するが、p300 は蛋白質アセチル化酵素活性を持っており p53 のリジン残基や p53 結合配列周辺のクロマチンヒストンをアセチル化し、基本転写因子の動員を促進し p53 結合配列周辺の遺伝子の転写活性化に働くことが知られている。

しかし、p300がp53の転写のコファクターとして機能するために、p300のみで十分であるのか、あるいは他の因子が必要であるのかはわかっていなかった。

## 2、結果と考察

### 第一章 クラスリン重鎖の p53 依存的転写における必要性

#### p53 結合蛋白質クラスリン重鎖の同定

p53 変異体の活性を解析し、Ser46 が Phe に置換した p53 (p53S46F) は野生型 p53 と比較して強い転写活性を有していることを示した。Ser46Phe 変異のように p53 活性が上昇する変異はほとんど例が無く、p53 による転写活性化機構を解析する上で有用と考えられたことから、p53S46F 変異体の解析を進めた。Ser46 は p53 の転写活性化領域に位置しており変異により p53 の転写に関わる因子との結合が変化したためであると考えられた。そこで p53 の結合蛋白質の探索をおこなったところ、p53 に対してクラスリン重鎖 (CHC) が結合していることが分かった。野生型よりも転写活性の上昇した p53S46F 変異体において、CHC への結合能が上昇していたことから、CHC の p53 依存性転写に関与している可能性が示唆された。

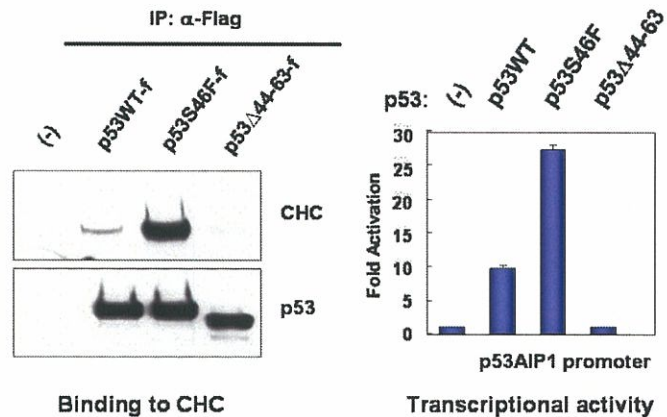


図2 p53へのCHCの結合

H1299細胞にp53-FLAGを発現させ、CHCとの結合を免疫沈降で解析した。p53変異体間でCHCへの結合能(左パネル)と転写活性(右パネル)を比較したところ、両者の間には正の関連性が見られた。

#### クラスリン重鎖の一部は核内に存在する

CHC は今までは、エンドサイトーシス時や、トランスゴルジ槽からリソソームへの小胞輸送時の小胞形成に必須の役割をする蛋白質であり、細胞質で機能する蛋白質として知られていた。CHC が核内で機能するという報告は今までに無かったので、まず CHC が核内に局在するかどうかを検討した。細胞分画や免疫電子顕微鏡による解析の結果、CHC の一部は核に存在することを始めて示した。

#### CHC は p53 による転写に必須である

CHC が p53 による転写に関わっていることが示唆されたことから、p53 依存性転写への CHC の寄与を解析した。そのために、RNA 干渉法で CHC の発現を減弱させたときの p53 依存性転写を解析したところ、CHC の発現を減弱させ

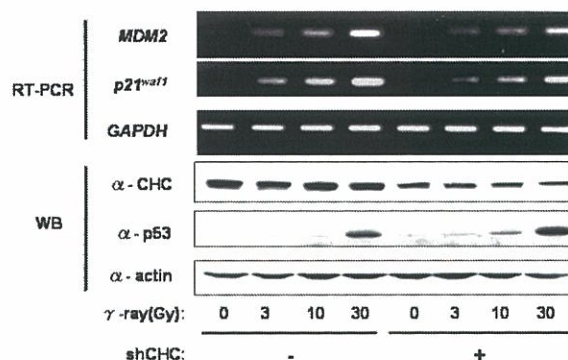


図3 p53依存性転写においてCHCが必要である

内在性野生型p53を発現するMCF-7細胞のCHCの発現をRNAiで抑制した。ガンマ線照射により、p53を活性化させたときのp53応答遺伝子(MDM2,p21<sup>waf1</sup>)の発現は、CHCの発現抑制により大きく減弱していた。

ると p53 による転写が大きく減弱していた事 (図 3) から、p53 による転写には CHC が必要であることが強く示唆された。さらにクロマチン免疫沈降法による解析の結果から、CHC は p53 の活性化に依存して p53 応答遺伝子のプロモーターに結合することが分かり、CHC が p53 に結合し、p53 による転写のコファクターとして機能することが強く示唆された。

### CHC は p53 と p300 との結合を増強する。

次に、CHC がどのようなメカニズムで p53 による転写の活性化をしているかを調べた。以前から p53 のコファクターとして知られる p300 の関与を検討した。CHC とともに、p300 を導入したところ、CHC あるいは p300 単独の場合よりも、p53 による転写活性が顕著に増強された事から、CHC は p300 と協調的に p53 による転写を活性化させていることが示唆された。さらに、CHC を細胞に強制発現させることにより、p53 と p300 との結合が強化された (図 4)。CHC は p53 と p300 との結合を促進させることで p53 による転写を活性化させていると考えられた。

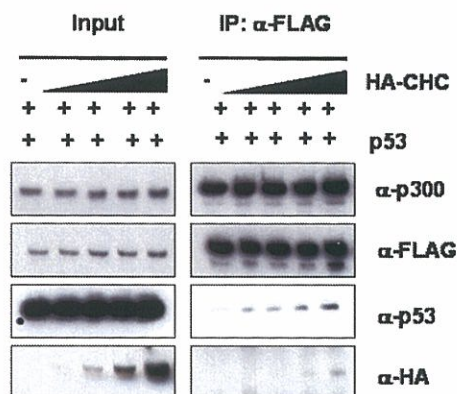


図4 CHCによるp53-p300結合の増強  
H1299細胞にp53-p300とともにCHCを発現させ、p300とp53との結合を免疫沈降法で解析した。CHCを導入することにより、p53とp300との結合が増強した。

## 第二章 p53 転写活性化時におけるクラスリン重鎖の多量体化状態

第一章では、p53 による転写には CHC が必須の役割をし、その機能は p300 と p53 との結合の媒介であることを示した。CHC はエンドサイトーシスや小胞輸送における機能には C 末端部の 3 量体形成ドメインを介した 3 量体形成が必須である。しかし、第一章で明らかとなった p53 による転写の活性化に CHC の 3 量体形成が必要であるのか、あるいは CHC のエンドサイトーシス・小胞輸送における機能が p53 による転写と関連しているのか、などの問題は解明されていない。そこで、p53 による転写の活性化に CHC の 3 量体化が必要であるかを解析した。

p53 結合部位の解析から、CHC と p53 との結合には CHC (全 1675 アミノ酸) の 833-1406 の領域で十分であり、p53 応答遺伝子のプロモーターを用いたレポーターアッセイから、CHC833-1406 は全長 CHC と同様に p53 による転写を活性化する機能が有ることが分かった (表 1)。

CHC	Trimerization	Endocytic activity	Enhancement of transcription by p53
1-1675	+	+	+
833-1406	-	-	+

表1 CHC変異体のエンドサイトーシスとp53活性化における機能の要約  
p53による転写の活性化には3量体形成、エンドサイトーシス活性化は必要ない

そこで、CHC833-1406 が 3 量体形成能を持つか否かを解析したところ、CHC833-1406 は全長 CHC とは異なり、3 量体を形成しないことがわかった。さらに CHC 断片のエンドサイトーシスに与える影響を解析したところ、全長 CHC がエンドサイトーシスを活性化できることとは異なり、

CHC833-1406 はエンドサイトーシスの活性化機能がなかったことから、CHC のエンドサイトーシス機能と p53 による転写の活性化は、独立した別個の機能であることが強く示唆された。

### 第三章 がんにおけるクラスリン重鎖の変異

第一章で CHC が p53 による転写活性化に必要であることが示されたことから、もし CHC の遺伝子に異常が起こっていれば、p53 の活性の低下を招き、発がんに関わっている可能性が考えられた。そこで、がんにおける CHC の遺伝子異常の有無を文献検索した結果、がんで CHC 遺伝子の関与した二種類の転座 (Anaplastic lymphoma kinase (ALK) 遺伝子、TFE3 遺伝子との転座) が報告されていた。それらの転座により異常な CHC との融合蛋白質が生じて、p53 活性に変化を及ぼす可能性が示唆された。そこで、第三章では p53 の活性化に及ぼす CHC 融合蛋白質の影響を解析し、CHC 遺伝子異常と発がんの関係について考察した。

がんで報告されていた CHC-ALK、CHC-TFE3 の融合蛋白質による p53 による転写に及ぼす影響を解析したところ、CHC 融合遺伝子は野生型 CHC と異なり p53 とともに導入したときに p53 による転写活性を上昇させる働きが大きく減弱していた。この結果より、CHC の転座が報告されたがんでは CHC の転座により p53 の機能が損なわれおり、CHC の遺伝子異常が発がんに関わることが示唆された (図 5)。

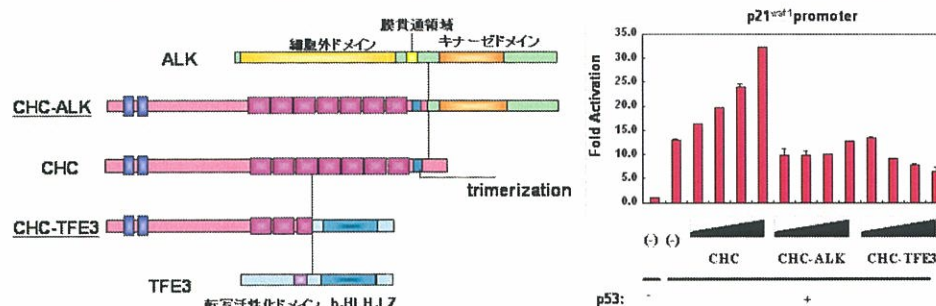


図5 癌で発見されたCHC融合蛋白質のp53活性化能の解析

がんではCHC-ALK、CHC-TFE3の二種類の転座が報告されている。それらの融合遺伝子産物のp53依存性転写に与える機能をp21<sup>ras</sup>プロモーターを用いたレポーターアッセイで解析した。その結果、野生型CHCとは異なりCHC融合遺伝子にはp53依存性転写を活性化させる能力が無いことが分かった。

### 3、総括

#### がん抑制蛋白

質 p53 には CHC が結合することが分かった。CHC は細胞質だけでなく核にも一部存在しており p53 活性化時に p53 応答遺伝子プロモーターに結合した。CHC の発現を抑制すると p53 応答遺伝子の誘導が減弱したことから、CHC は p53 による転写に必須であった。CHC による p53 活性化には CHC によるエンドサイトーシスは必要ないことがわかった。CHC は p53 と p300 の結合を増強することで p53 による転写を活性化しており、p300 による p53 活性化には CHC が必要であることが強く示唆された。

一部のがんでは CHC と他の遺伝子の融合遺伝子が生じているが、その CHC 融合遺伝子は野生型 CHC と異なり、p53 による転写を活性化することができなかった。この結果より CHC の遺伝子異常が p53 の機能欠損を引き起こし、発がんに関与している可能性が示唆された。