

氏 名	リン ケツ キ 林 潔 宣
学位の種類	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 540 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	ウイルス感染によるp53の機能的抑制並びにp53の修飾制御の分子機構

論文調査委員 (主 査) 教授 下遠野邦忠 教授 川 寄 敏 祐 教授 河 合 明 彦

論 文 内 容 の 要 旨

癌抑制遺伝子である p53 は、外界からの様々なストレスにより量的、質的調節を受け、細胞周期停止、DNA の修復や細胞死を誘導することにより、細胞の命運を決定する転写因子である。そして p53 遺伝子は様々な癌細胞で高頻度に変異欠失しており、p53 の機能調節機構を解析することは発癌のメカニズムを明らかにするのみでなく、新しい治療法の開発にも重要である。

一方、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染細胞では、タンパク質レベルでの p53 は非常に安定化しているにもかかわらず、その転写活性は著しく抑制されている。これにはウイルス由来の転写調節因子 Tax が深く関わる事が明らかにされているが、その詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では Tax による p53 の転写抑制機構の解明を第一の目的とした。

また p53 はリン酸化、アセチル化、ユビキチン化などの翻訳後修飾により、その機能が厳密に制御されることが明らかになっている。特に近年、ユビキチン様タンパク質の一つである SUMO 化修飾は、p53 をはじめ多くの癌抑制タンパク質や各種転写因子の機能制御に重要な翻訳後修飾のひとつとして注目されつつある。そこで本研究では、p53 におけるリン酸化による SUMO 化の多段階修飾制御機構の解明を第二の目的とした。

第一章 HTLV-1 由来の癌原タンパク質 Tax は、転写コアクチベーター CBP との結合を p53 と拮抗することにより、p53 を介した転写活性化能を抑制する

発癌の過程において、p53 の機能的抑制は主要な原因のひとつとなる場合が多い。またウイルス感染によって不死化した細胞では、ウイルス由来のタンパク質、例えば SV40 の large-T 抗原、パピローマウイルスの E6 やアデノウイルスの E1B などが p53 と直接相互作用することによって、その機能を抑制している。今までに HTLV-1 感染細胞及び Tax 発現細胞では、p53 の転写活性化能が著しく抑制されていることが明らかにされており、Tax による p53 の機能的抑制が示唆されている。しかし、Tax と p53 との直接の相互作用はなく、また Tax による p53 の m-RNA 発現量や細胞内局在、DNA の結合能などには変化なく、翻訳後修飾や転写共役因子などを介した抑制機構の可能性が示唆される。今回私は、Tax と p53 の双方の転写コアクチベーターとして機能することが知られる CBP/p300 に着目し、解析を行った。まず、Tax による p53 の転写抑制作用が Tax の CBP/p300 と相互作用できない変異体では認められないことをレポーターアッセイにより明らかにした。そしてこの抑制作用は、p53 のファミリーであり同様に転写活性化に CBP/p300 を必要とする p73 においても認められた。これらの結果は、細胞内に限られた量存在する CBP/p300 を Tax と p53 が競合することにより、Tax は結果的に p53 の機能的制御を来すことを強く示唆する。以上の結果は、癌ウイルス由来のタンパク質による p53 の機能抑制機構の一つを明らかにしただけでなく、Tax と CBP/p300 の相互作用を抑制することにより、p53 の機能を維持し、発癌状態から元に復帰するような創薬の開発にも応用できると考える。

第二章 p53 の Ser20 のリン酸化は Ubc9 との相互作用能が低下することで SUMO 化修飾が抑制される。

転写因子である p53 の機能は、様々な翻訳後修飾により厳密に制御されることが明らかとなっている。特に近年、リン酸化によるユビキチン化、アセチル化などの翻訳後の多重修飾による機能制御が明らかになりつつあり、注目されている。今回私は、p53 のリン酸化による SUMO 化修飾機構に着目し、解析を行った。その機能の重要性が報告されている p53 上の主なリン酸化部位であるセリン残基をグルタミン酸残基に置換した擬態変異体 (S20E, S46E, S392E) を作製し、細胞内での SUMO 化修飾の程度を検討した。その結果、S20E 変異体では SUMO 化修飾が顕著に抑制されることを見出した。さらにこの制御機序を解析し、S20E では SUMO 化の E2 リガーゼである Ubc9 との相互作用が著しく低下している事を明らかにした。

p53 の 20 番目セリン残基は、抗癌剤や UV 照射などにより活性化されるチェックポイントキナーゼの一つである Chk2 によりリン酸化されることが明らかとなっており、p53 の細胞周期依存的な DNA 修復機能発現に重要な修飾機構である。そこで私は、抗癌剤の一種であるアドリアマイシン処理による p53 と Ubc9 の相互作用、さらに SUMO 化修飾の程度を検討した。その結果、アドリアマイシン処理による p53 Ser20 の顕著なリン酸化に伴い、Ubc9 との相互作用の低下、そして SUMO 化修飾の抑制を認めた。以上の結果は、リン酸化による SUMO 化修飾の抑制機序を明らかにしただけでなく、さらなる p53 の機能発現機構を明らかにしていく上で、非常に重要な知見である。

論文審査の結果の要旨

癌抑制遺伝子である p53 は、様々な癌の発症に関連していると考えられている。ヒトの様々な癌細胞で p53 遺伝子は高頻度に変異、欠失しており、p53 の機能調節機序を解析することは発癌のメカニズムを明らかにするのみでなく、新しい治療法の開発にも重要と考えられている。

本論文は、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 由来の転写調節因子 Tax による p53 の転写抑制機構と p53 の翻訳後修飾の調節機構を解明したものであり、得られた成果は以下の通りである。

今までに HTLV-1 感染細胞及び Tax 発現細胞では、p53 の転写活性が著しく抑制されていることが明らかにされており、Tax による p53 の機能的抑制が示唆されていた。しかし、Tax と p53 との直接の相互作用はなく、また Tax による p53 の m-RNA 発現量や細胞内局在、DNA の結合能などには変化なく、翻訳後修飾や転写共役因子などを介した抑制機序の可能性が示唆されていたので、Tax と p53 の双方の転写コアクチベーターとして機能することが知られる CBP/p300 に着目し、解析を行った。まず、Tax による p53 の転写抑制作用が Tax の CBP/p300 と相互作用できない変異体では認められないことをレポーターアッセイにより明らかにした。そしてこの抑制作用は、p53 のファミリーであり同様に転写活性化に CBP/p300 を必要とする p73 においても認められた。これらの結果は、細胞内に限られた量存在する CBP/p300 を Tax と p53 が競合することにより、Tax は結果的に p53 の機能的制御を来すことを強く示唆する。以上の結果は、癌ウイルス由来のタンパク質による p53 の機能抑制機構の一つを明らかにしただけでなく、Tax と CBP/p300 の相互作用を抑制することにより、p53 の機能を維持し、発癌状態から元に復帰するような創薬の開発にも応用できると考える。

一方、p53 はリン酸化、アセチル化、ユビキチン化などの翻訳後修飾により、その機能が厳密に抑制されることが明らかになっている。特に近年、ユビキチン化様タンパク質の一つである SUMO 化修飾は、p53 をはじめ多くの癌抑制タンパク質や各種転写因子の機能制御に重要な翻訳後修飾のひとつとして注目されつつある。そこで、本研究では、p53 におけるリン酸化による SUMO 化の多段階修飾制御機構の解析を行った。

転写因子である p53 の機能は、様々な翻訳後修飾により厳密に制御されることが明らかとなっている。特に近年、リン酸化によるユビキチン化、アセチル化などの翻訳後の多重修飾による機能制御が明らかになりつつあり、注目されている。p53 のリン酸化による SUMO 化修飾機構に着目し、解析を行った。その機能の重要性が報告されている p53 上の主なリン酸化部位であるセリン残基をグルタミン酸残基に置換した擬態変異体 (S20E, S46E, S392E) を作製し、細胞内での SUMO 化修飾の程度を検討した。その結果、S20E 変異体では SUMO 化修飾が顕著に抑制されることを見出した。さらにこの制御機序を解析し、S20E では SUMO 化の E2 リガーゼである Ubc9 との相互作用が著しく低下している事を明らかにした。

p53 の 20 番目セリン残基は、抗癌剤や UV 照射などにより活性化されるチェックポイントキナーゼの一つである Chk2 によりリン酸化されることが明らかとなっており、p53 の細胞周期依存的な DNA 修復機能発現に重要な修飾機構である。そ

こで抗癌剤の一種であるアドリアマイシン処理による p53 と Ubc9 の相互作用，さらに SUMO 化修飾の程度を検討した。その結果，アドリアマイシン処理による p53 Ser20 の顕著なリン酸化に伴い，Ubc9 との相互作用の低下，そして SUMO 化修飾の抑制を認めた。以上の結果は，リン酸化による SUMO 化修飾の抑制機序を明らかにしただけでなく，さらなる p53 の機能発現機構を明らかにしていく上で，非常に重要な知見である。

よって，本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に，平成16年2月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。