

【目的】 がん抑制タンパク質 p53 は、DNA が損傷した際に DNA 修復を誘導し、修復が困難であればアポトーシスを誘導することで細胞のがん化を防ぐという機能を有しており、「細胞の番人」と呼ばれている (図)。がんの約半数で p53 の機能喪失が見られ、p53 の機能を保持することはがん治療・予防の観点から非常に重要であるが、p53 をターゲットとした治療法の確立が難航している。p53 は、転写活性化ドメイン、DNA 結合ドメイン、四量体化ドメインからなるが、p53 の DNA 結合ドメインは凝集することが報告されており (図)、さらにホットスポット変異の導入により凝集性が高くなることも報告されている。このことから機能を有する p53 が、すでに形成された凝集体に取り込まれることで p53 の機能が喪失し、がん化する説が提唱されている。一方で、凝集体としては“アモルファス (不定形な) 凝集体”や“アミロイド凝集体”など複数の形態の混合状態であることがわかっているものの、凝集体の形状が不均一であるため解析は進んでいないのが現状である。本研究では独自に発見した、p53 のアミロイド凝集体形成法により調製した p53 アミロイド凝集体の詳細な分析を行い、これまではアモルファス凝集体とアミロイド凝集体が同時に生成するために困難であった p53 アミロイド凝集体の分析を可能にすることである。これにより、がんにおける p53 アミロイド凝集体の関連が明らかとなる。

【方法】 野生型 p53-DNA 結合ドメイン (p53-DBD) タンパク質は GST 融合型として大腸菌発現系にて作製、精製し調製した。試験管系での p53-DBD のアモルファス凝集体およびアミロイド凝集体は、蛍光色素 8-(phenylamino)-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) および Thioflavin T (ThT) にてモニタリングした。また、SK-BR-3 細胞の p53 を、市販の p53 抗体 Pab240、DO-1、および自作 p53 アミロイド認識ポリクローナル抗体にて蛍光細胞免疫染色した。さらに、¹⁵N 標識 p53-DBD 溶液の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを 900 MHz NMR 分光器 (Avance III, Bruker, Karlsruhe, Germany)・三重共鳴クライオプローブで取得した。

【結果】 ANS の蛍光によりアモルファス凝集体を、ThT の蛍光によりアミロイド凝集体をモニターした。p53-DBD に試薬 A を添加することでアモルファス凝集体の形成が大幅に抑制されると同時にアミロイド凝集体の形成が大幅に促進されることを発見した。p53-DBD が形成するアミロイド凝集体をさらに詳細に分析するために、p53-DBD を認識可能なポリクローナル抗体を作出し、p53 の変異を有する培養がん細胞 SK-BR-3 細胞にて蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、市販抗体では見られない、細胞質に顆粒様の凝集体が確認できた。加えて、p53-DBD と試薬 A が直接相互作用するか確認するために、精製した ¹⁵N 標識 p53-DBD タンパク質溶液の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを、試薬 A の添加前後で取得した。¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを比較したところ、多くのピークの変化が確認でき、試薬 A と p53-DBD の直接的な作用が示唆された。

p53の凝集体形成によるがん化メカニズムの概念図

