

山内基弘 論文内容の要旨

主 論 文

放射線照射後のセリン 15、スレオニン 18、セリン 20
アラニン置換型 p53 蛋白質の安定化

Stabilization of alanine substituted p53 protein at Ser15, Thr18, and Ser20
in response to ionizing radiation

山内基弘、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己

Biochemical and Biophysical Research Communications
Vol. 323, 906-911, 2004

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻
(主任指導教員：朝長万左男教授（代理）)

緒 言

p53 遺伝子の変異はヒト癌で最も多く見られる遺伝子異常であることから、*p53* 遺伝子産物である p53 蛋白質が発癌抑制において中心的な役割を果たしていることが明らかである。p53 蛋白質は *p21* などの遺伝子の発現を制御する転写因子であり、普段は MDM2 蛋白質によりその発現量および活性が低レベルに保たれているが、放射線照射などでゲノムに DNA 損傷が誘起されると蓄積・活性化し、下流遺伝子の発現を誘導して細胞周期停止に働く。高発癌性の毛細血管拡張性運動失調症患者由来の細胞では、放射線照射後の p53 蛋白質の蓄積に異常が見られることから、本疾患の原因遺伝子産物である ATM 蛋白質が関与する p53 蛋白質の N 末端から 15 番目のセリン(セリン 15)、18 番目のスレオニン (スレオニン 18)、20 番目のセリン (セリン 20) のリン酸化が p53 蛋白質蓄積に重要な修飾であると考えられる。本研究では、放射線照射後の p53 蛋白質の蓄積における ATM 蛋白質依存的なセリン 15、スレオニン 18、セリン 20 のリン酸化の関与を、リン酸基転位反応を受けないアミノ酸であるアラニンに置換した p53 蛋白質発現誘導系を樹立することにより解明した。

対象と方法

セリン 15、スレオニン 18、セリン 20 のリン酸化の影響を検討するため、それぞれのアミノ酸の単一アラニン置換体、二重部位アラニン置換体、三重部位アラニン置換体を作製し、野生型 *p53* 遺伝子とともに p53 発現誘導ベクターを構築した。ベクターは、内在性の野生型 p53 蛋白質の放射線照射後の蓄積が確認されたヒト線維肉腫由来 HT1080 細胞に導入して発現クローンを単離した。なお HT1080 細胞の内在性の野生型 p53 蛋白質と区別するため、p53 発現ベクターは C 末端に V5/His タグが融合した p53 蛋白質 (以下 p53-V5/His 蛋白質) が発現するように構築した。放射線照射前後の *p53-V5/His* の mRNA 量は RT-PCR により、p53-V5/His 蛋白質量は抗 V5 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、p53 蛋白質の局在性は抗 V5 抗体を用いた蛍光免疫染

色法により検討した。アラニン置換型 p53-V5/His 蛋白質の X 線照射後の蓄積は、独立に単離した 5 個のクローンにおける結果から評価した。

結 果

まず HT1080 細胞に導入し発現させた野生型 p53-V5/His 蛋白質の 4 Gy X 線照射後の蓄積を内在性の野生型 p53 蛋白質と比較した。その結果、p53-V5/His 蛋白質および内在性 p53 蛋白質のレベルはともに照射 2 時間後にピークとなりその後減少していくという同じ動態を示すことが分かった。X 線照射後の *p53-V5/His* mRNA 量を検討した結果、野生型 *p53-V5/His* の mRNA 量もセリン 15、スレオニン 18、セリン 20 全ての部位のアラニン置換型 *p53-V5/His* の mRNA 量も照射前と 4 Gy 照射 2 時間後で変化は見られず、p53 蛋白質の蓄積が転写後の修飾により制御されていることが明らかになった。次にセリン 15、スレオニン 18、セリン 20 のそれぞれの単一部位アラニン置換型 p53-V5/His 蛋白質の 4 Gy 照射 2 時間後のレベルおよび局在性を野生型 p53-V5/His 蛋白質と比較した。その結果、いずれの部位のアラニン置換型 p53-V5/His 蛋白質も全てのクローンにおいて照射後レベルが増加し、野生型 p53-V5/His 蛋白質と同様に核内に蓄積していた。リン酸化部位の二重部位、三重部位アラニン置換体についても同様の検討を行ったが、いずれのアラニン置換型 p53-V5/His 蛋白質も全てのクローンで野生型 p53-V5/His 蛋白質と同様な核内における蓄積が観察された。

考 察

放射線照射前後で *p53* mRNA レベルに変化がなかったことから放射線照射後の p53-V5/His 蛋白質の蓄積は mRNA 合成量の増加によるものではなく、p53 蛋白質の分解の抑制、すなわち安定化によって起こることが明らかになった。セリン 15、スレオニン 18、セリン 20 いずれの部位の単一、二重、三重置換型 p53-V5/His 蛋白質も照射後野生型 p53-V5/His 蛋白質と同様に核内に蓄積したことから、ATM 蛋白質が関与するこれら三部位いずれのリン酸化も X 線照射後の p53 蛋白質の安定化に必須ではないことが示された。ATM 蛋白質は、p53 蛋白質以外にも多数の放射線応答分子のリン酸化にかかわっていることから、ATM 蛋白質は p53 蛋白質以外の蛋白質のリン酸化を介して X 線照射後の p53 蛋白質の安定化に関与している可能性を提唱する。