

がん抑制タンパク質 p53 の四量体形成

鎌 田 瑠 泉, 坂 口 和 靖

がん抑制タンパク質 p53 は遺伝毒性ストレスに応答して活性化し、細胞周期停止やアポトーシスを誘導して細胞のがん化を抑制している。p53 の四量体形成は機能発現に必須であり、細胞内タンパク質量・翻訳後修飾・タンパク質間相互作用などの様々な要因により制御されている。p53 の複雑な制御機構を理解するためには、これらの要因と四量体形成とが相互に及ぼす影響を詳細に解析していくことが必要である。本稿では、ペプチドを用いた p53 の四量体形成ドメインの同定・構造安定性解析を基に、四量体形成による p53 機能の調節機構について紹介する。

1. はじめに

がん抑制タンパク質 p53 は、遺伝毒性ストレスに対する細胞周期調節のための多様なネットワークの最も重要な“ハブ (hub)”タンパク質である。p53 は紫外線、放射線などの遺伝毒性ストレスに応答して活性化され、細胞周期停止、アポトーシスを誘導する様々な下流遺伝子の転写を活性化する転写因子として、細胞ゲノム情報の完全性を保つ機構の中心的な働きをしている¹⁻³⁾。また、p53 は転写因子としての機能だけでなく、直接ミトコンドリアで機能してアポトーシスを誘導し、さらには Drosha と相互作用することで microRNA (miRNA) のプロセッシングに関与することも明らかとなっている⁴⁾。さらに最近、p53-p21 経路が iPS 細胞樹立を抑制していることが報告されるなど⁵⁾、p53 は細胞内の様々なプロセスに関与していることが分かっている (図 1)。

p53 はホモ四量体を形成するタンパク質であり、p53 の DNA 結合能、タンパク質間相互作用、核内・核外移行などの様々な機能は p53 の多量体構造に依存しており、四量

体形成が p53 の機能発現に必須である⁶⁻¹¹⁾。p53 の四量体と単量体は平衡関係にあり、タンパク質量・翻訳後修飾などにより四量体形成は影響を受ける。p53 は遺伝毒性ストレスに応答して翻訳後修飾されることにより安定化・活性化され、活性型四量体 p53 により機能を発揮すると考えられている。細胞内 p53 の制御機構を解明するためには、p53 の四量体構造およびその安定性、翻訳後修飾が及ぼす影響を定量的に解析する必要がある。しかしながら、細胞内 p53 の四量体構造の安定性および翻訳後修飾・タンパク質レベル増加による四量体の安定化を定量的に解析することは容易ではない。本稿では、ペプチドを用いた p53 四量体形成に関わる研究を中心に、p53 多量体形成ドメインの同定から、その詳細な構造、安定性解析結果について紹介する。さらに、ペプチドを用いて得られた精密な定量的解析結果を基に、細胞内での p53 の四量体形成と機能調節、および p53 の四量体形成ドメイン変異による不安定化とがん化との関連について解説する。

2. p53 四量体形成ドメインの同定・構造

ヒト p53 は 393 アミノ酸残基からなり、N 末端側から五つの主要なドメイン (転写活性化ドメイン、プロリンリッチドメイン、DNA 結合ドメイン、四量体形成ドメイン、塩基性ドメイン) で構成されている (図 2)。1994 年、著者らが p53 四量体形成ドメイン同定の研究を始めた当時明らかとなっていたのは、p53 の C 末端側約 1/4 の領域が多量体形成に関わっていることであつた。四量体形成ドメ

北海道大学大学院理学研究院化学部門生物化学研究室
(〒060-0810 北海道札幌市北区北 10 条西 8 丁目)

Tetramerization of tumor suppressor protein p53

Rui Kamada and Kazuyasu Sakaguchi (Laboratory of Biological Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, North 10, West 8, Kita-ku, Sapporo 060-0810, Japan)

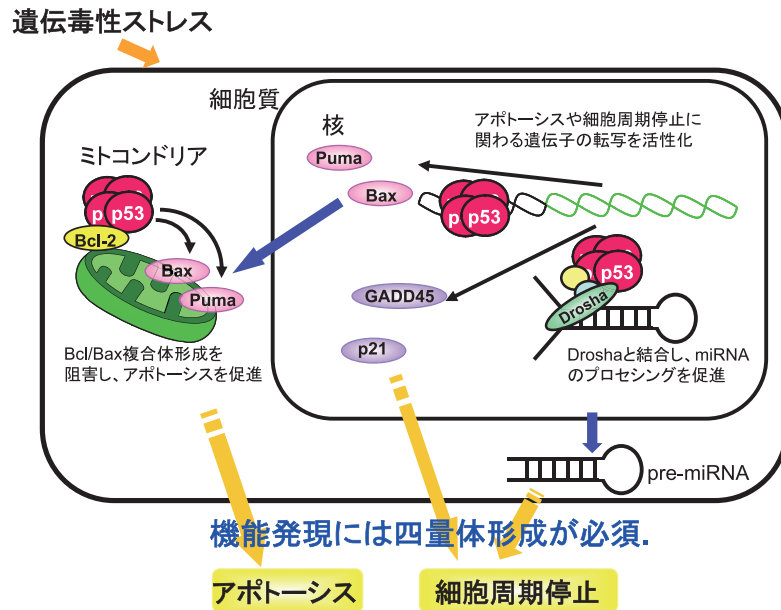


図1 がん抑制タンパク質 p53 の機能

p53 は遺伝毒性ストレスに応答して活性化・安定化・四量体形成し、1. ミトコンドリアでのアポトーシス促進、2. 様々な下流遺伝子の転写活性化、3. miRNA プロセッシングの促進など、様々な機能を発揮する。これらの機能により、遺伝毒性ストレスに応答したアポトーシス・細胞周期停止が誘導される。



図2 p53 のドメイン構造

ヒト p53 は 393 アミノ酸残基からなり、N 末端側から転写活性化ドメイン (TAD)、プロリンリッチドメイン (PRD)、DNA 結合ドメイン (DBD)、四量体形成ドメイン (TD)、塩基性ドメイン (BD) の五つの主要なドメインから構成されている。

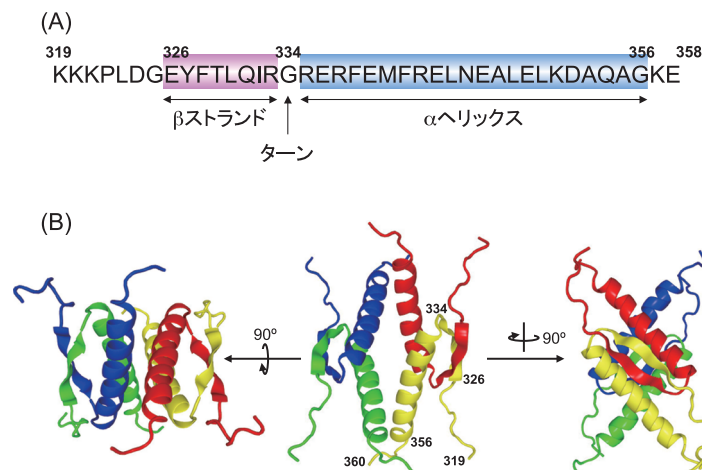


図3 p53 四量体形成ドメインの構造 (pdb:3sak)

(A) 四量体形成ドメインのアミノ酸配列

四量体形成ドメインはβストランド (326-333 位)、ターン (334 位)、αヘリックス (335-356 位) から構成される。

(B) 四量体形成ドメインのNMR 構造

二つの逆平行βシートと4ヘリックスバンドルにより四量体を形成する。矢印で示した四つのN末端は立方体の頂点に位置しているとみなすことができる。

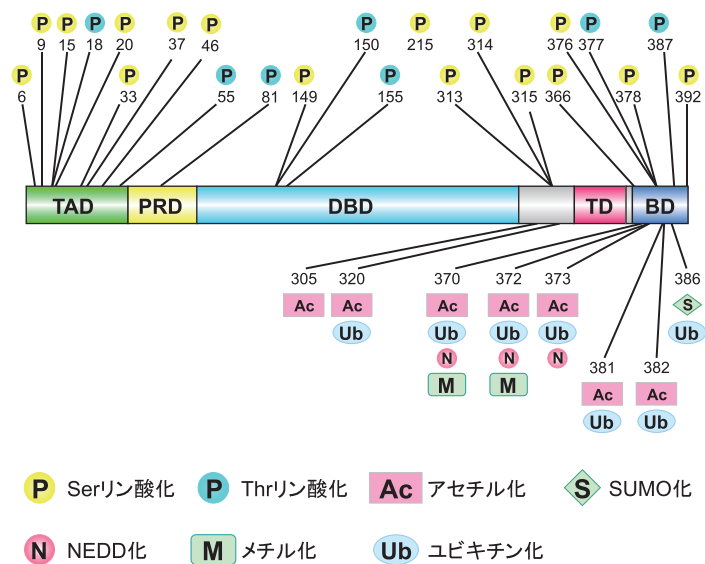


図 4 p53 のドメイン構造と翻訳後修飾部位
p53 の N 末端側と C 末端側には翻訳後修飾を受ける部位が多数存在し、遺伝毒性ストレスに応答した修飾により、p53 の安定性・DNA 結合能・転写活性・四量体の安定性が制御されている。

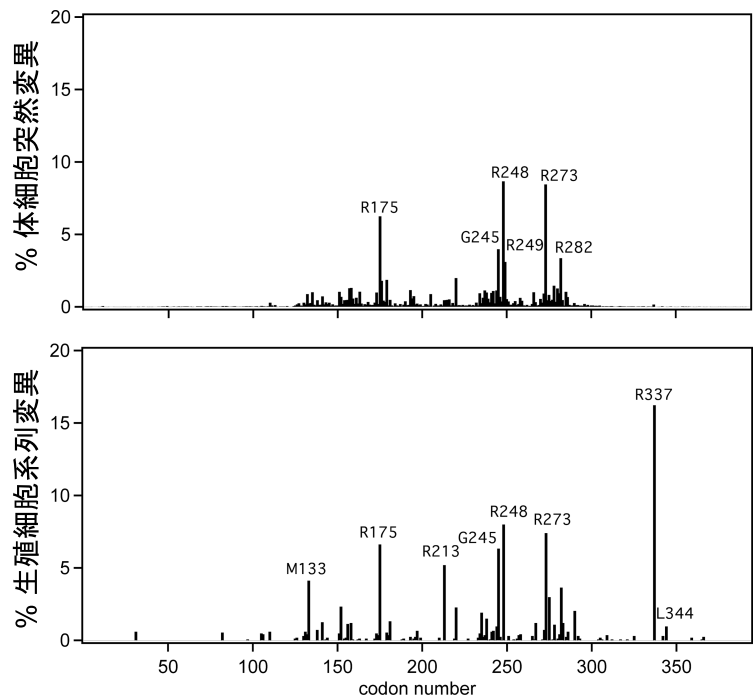


図 5 p53 に見られるミスセンス変異の頻度
上：各アミノ酸残基の体細胞突然変異の頻度とホットスポット変異
下：各アミノ酸残基の生殖細胞系列変異の頻度
IARC TP53 Mutation Database, release R14, November 2009⁴³⁾

表1 ヒト悪性腫瘍に見られる四量体形成ドメインのミスセンス変異

変異		腫瘍		変異		腫瘍	
Glu	326	Gly	皮膚がん βストランド	Arg	337	Pro	肺がん、乳がん
Tyr	327	Asp	結腸直腸がん	Phe	338	Ile	乳がん
		His	皮膚がん			Leu	副腎がん
		Ser	乳がん	Glu	339	Gln	乳がん
Phe	328	Leu	皮膚がん			Lys	頭頸部がん
		Ser	結腸直腸がん	Phe	341	Cys	乳がん、前立腺がん
		Val	胃がん	Arg	342	Gln	咽頭がん、前立腺がん
Thr	329	Ile	頭頸部がん			Leu	脳腫瘍
		Ser	卵巣がん			Pro	乳がん、卵巣がん
Leu	330	Arg	乳がん	Glu	343	Gly	大腸がん、肺がん
		His	肝臓がん、卵巣がん	Leu	344	Arg	膀胱がん
		Pro	結腸直腸がん			Pro	下咽頭がん
Gln	331	Arg	前立腺がん	Glu	346	Ala	鼻咽頭がん
		His	乳がん、肺がん	Ala	347	Gly	脳腫瘍
		Pro	食道がん			Thr	肺がん、乳がん、卵巣がん
Ile	332	Val	卵巣がん	Leu	348	Phe	肺がん
Gly	334	Trp	肺がん ターン			Ser	中咽頭がん
		Val	肺がん	Glu	349	Asp	膀胱がん
Arg	335	Gly	膵臓がん αヘリックス	Asp	352	His	食道がん
		His	肺がん	Ala	353	Thr	膀胱がん
		Leu	口腔がん	Gln	354	Arg	腎臓がん
Arg	337	Cys	骨肉腫、脳腫瘍、乳がん、 結腸直腸がん、食道がん			Glu	リンパ腫
						Lys	頭頸部がん
		His	副腎がん、肝臓がん	Gly	356	Ala	膵臓がん
		Leu	乳がん、前立腺がん			Trp	子宮体がん

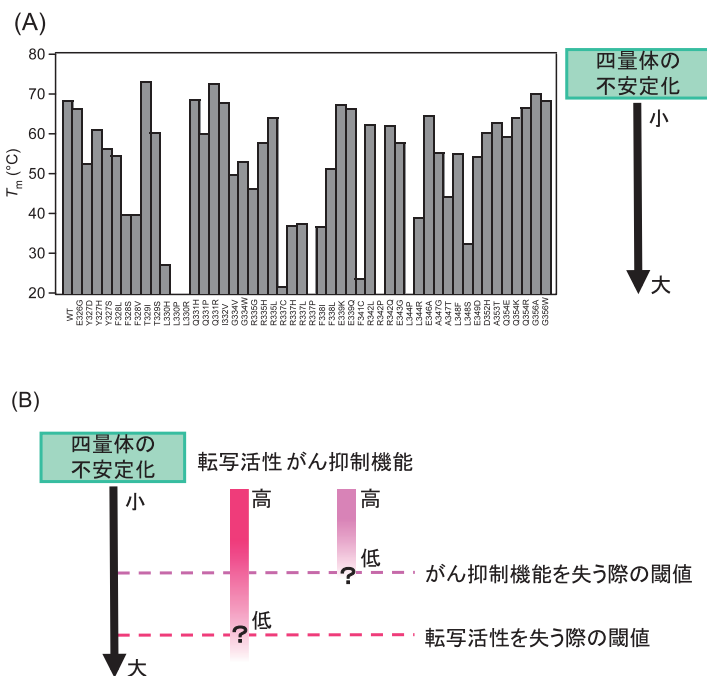


図6 四量体形成ドメインの変異が四量体構造に及ぼす影響

(A) 四量体形成ドメイン変異型ペプチドの熱安定性。温度上昇に伴う 222 nm の CD 値を測定し、四量体の半分が変性して単量体となる時の温度 (T_m) を求めた。

(B) 四量体構造不安定化により転写活性・がん抑制機能が低下する。四量体構造の安定性・転写活性・がん抑制機能を定量的に解析することで、四量体構造が不安定化し、転写活性やがん抑制機能を失う際の閾値を明らかにできると考えられる。

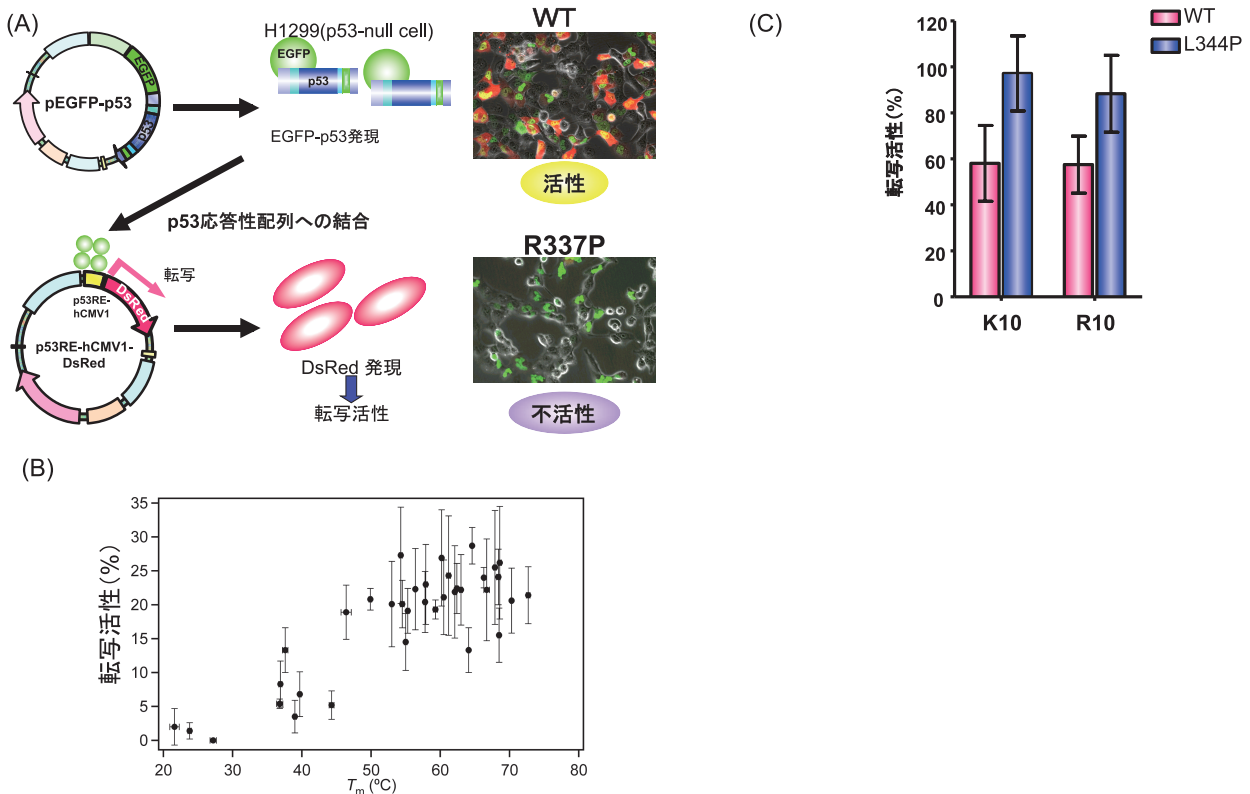


図 7 四量体形成ドメイン変異型 p53 タンパク質の転写活性

(A) 生細胞における p53 転写活性解析法。EGFP 融合 p53 タンパク質発現ベクターと p53 応答性配列を持ち、下流に DsRed の配列を持つレポーターベクターを p53 null の H1299 に導入する。緑色蛍光強度から p53 タンパク質量、赤色蛍光強度から転写活性を定量する。

(B) 変異型 p53 タンパク質の転写活性と変異型ペプチド安定性の相関。横軸に変異型ペプチドの安定性 (T_m)、縦軸に変異型 p53 タンパク質の転写活性 (EGFP-p53 が発現している細胞中の DsRed を発現している細胞の割合) をプロットした。四量体構造の安定性が減少すると、p53 タンパク質の転写活性も減少している。

(C) K10-p53tet, R10-p53tet による p53 転写活性の阻害効果。ペプチドを加えていないときの転写活性を 100% とした。ヘテロ四量体を形成する WT では転写活性が約 60% 低下しているが、四量体を形成できない変異型 L344P ではその阻害効果がほとんど見られない。

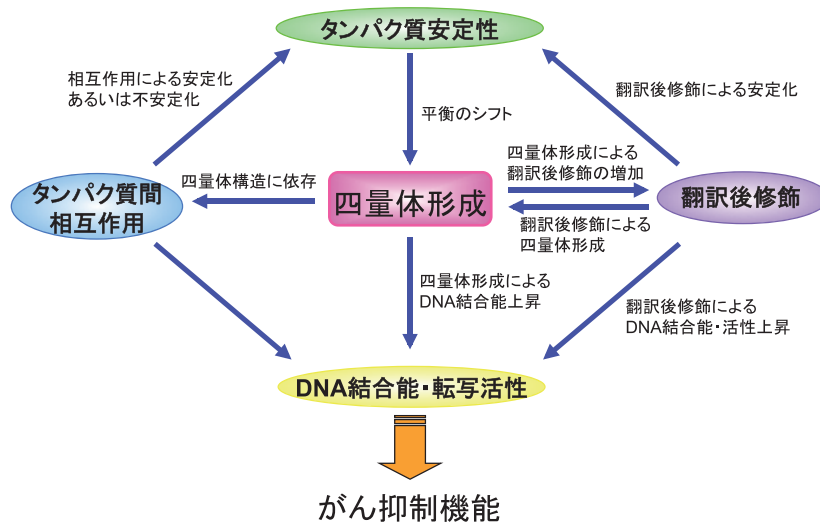


図 8 p53 四量体形成による翻訳後修飾・機能の変化

四量体形成および翻訳後修飾・タンパク質安定性・タンパク質間相互作用は互いに影響しあい、p53 の DNA 結合能・転写活性などの機能を制御している。

インの位置を決定するため、p53 の 303 位-393 位周辺の配列を持つ 9 種のペプチドを通常の Fmoc 固相法、あるいは相本らのチオエステル法によるセグメント縮合により合成した^{12,13)}。合成した各ペプチドの沈降平衡法による超遠心分析を実施した結果、319-360 位が四量体形成のためのコアドメインを含むことが明らかとなった¹⁴⁾。さらに、四量体を形成するペプチドの CD スペクトルの α ヘリックス含有率が高いこと、また、クロスリンキングの実験より逆平行の 4 ヘリックスバンドルを形成することが予想された。

Clore らとの共同研究により、p53 四量体形成ドメインの NMR による立体構造が明らかとなった。四量体形成ドメインは N 末端側から β ストランド (Glu326-Arg333)、ターン (Gly334)、 α ヘリックス (Arg335-Gly356) で構成されている^{15,16)}。逆平行 β シートによりプライマリーダイマーが形成され、二つのプライマリーダイマーが 4 ヘリックスバンドルを介して二量体の二量体として対称な四量体が形成される (図 3)。この四量体構造において、4 個の N 末端と C 末端は模式的に立方体の頂点に位置しており、DNA 結合ドメインと C 末端側の塩基性ドメインが互いに三次元空間で近接した位置に配置されると考えられる。この構造は、p53 タンパク質四量体の 4 個の DNA 結合ドメインが 2 個のパリンドローム配列中にある 4 個の結合部位と相互作用する際の、DNA の折れ曲がりにも重要であると思われる。また、X 線結晶構造解析^{17,18)}による立体構造も明らかになっている。

Fersht らは、326 位-353 位までの各残基のアラニンスキャニング法により、四量体構造安定化およびフォールディングに重要な残基を明らかにしている¹⁹⁾。四量体の界面に存在する Leu344, Leu348, Met340, 疎水性コアを形成する Phe328, Arg337, Phe338, 疎水性コアの中心に位置する残基 Ile332, Leu330, Phe341 の 9 個の疎水性アミノ酸残基の Ala 置換により、四量体構造が大きく不安定化したことから、これらの残基が四量体構造形成および安定化に重要であることが判明している。また、四量体形成ドメインは疎水性相互作用だけでなく、Arg337-Asp352 間の静電的相互作用によっても安定化している。さらには、分子動力学シミュレーションにより、Arg337, Asp352 の静電相互作用には二つの残基 Arg333, Glu349 も関与していることが示されている²⁰⁾。さらに、ストップフロー CD、蛍光法による四量体形成ドメインのフォールディング解析から、変性状態の単量体はフォールディングして、まずネイティブな構造とは異なる構造を持った遷移状態である二量体を形成することが明らかにされている²¹⁾。続いて、ネイティブな構造と似た構造の二量体へと構造変化し、その二量体同士が会合して四量体を形成する。一方、四量体構造のアンフォールディング過程では、中間体は観測されず、四量体から単量体へ変性することが示されている。

四量体構造の立体構造を基に、疎水性コアに存在する残基の中の、プライマリーダイマー間の疎水性アミノ酸を置換することにより、天然型のプライマリーダイマーと同様の構造を持つ二量体変異体 M340Q/L344R や²²⁾、プライマリーダイマーとは異なる構造を持つ二量体変異体 M340K/F341I/L344Y が作成されている²³⁾。また、著者らは、341 位の Phe を非天然型のアミノ酸であるシクロヘキシルアラニン (Cha) に置換することで、p53 ペプチド四量体構造が飛躍的に安定化 ($T_m > 100^\circ\text{C}$) することを見出している。この超安定構造は、Phe よりも嵩高く自由度の高い Cha が四量体構造中の空隙を埋めることによって達成されていると考えられる。Cha はこのような環境における Phe の有用なアナログであり、安定な酵素やペプチド性薬剤の設計などへの応用に有用な手法となることが期待される。

3. 四量体構造の安定性と翻訳後修飾

p53 の四量体形成は、DNA 結合・転写活性化能に重要である²⁴⁻²⁶⁾。p53 の N 末端領域と C 末端領域には様々な翻訳後修飾を受ける部位が存在し、遺伝毒性ストレスに応答した翻訳後修飾により p53 のタンパク質安定性・四量体構造の安定性・転写活性化能などが制御されている²⁾ (図 4)。著者らは、p53 の C 末端領域の Ser315, Ser378, Ser392 のリン酸化が四量体構造に及ぼす効果を解析するため、315 位、378 位、392 位にそれぞれリン酸化セリンを導入した p53C 末端 (319-393 位) ペプチドアナログを化学合成した。合成した各ペプチドを用いた超遠心分析により四量体-単量体間の解離定数を求めた。その結果、392 位のリン酸化により非リン酸化時と比べて 10 倍近く四量体形成が促進することが明らかとなった。315 位、378 位のリン酸化は四量体形成にほとんど影響を及ぼさなかったが、315 位のリン酸化は 392 位の安定化効果を打ち消すことが示された。p53 は細胞ストレスに応答して数々の翻訳後修飾を受けることから、ストレスに応答した C 末端領域の Ser392 のリン酸化により p53 の四量体構造の安定化が制御されていることが考えられる。また、p53C 末端領域のリン酸化により 14-3-3 ファミリータンパク質と p53 の結合が増加するという報告もある²⁷⁾。一方、疎水性コアに位置する Met340 の酸化剤によるメチオニンスルホキシドへの酸化が、四量体構造を大きく不安定化することが示されている²⁸⁾。Met340 酸化型ペプチドはスルホキシド基同士の電荷の反発や立体障害により四量体構造が不安定化していると考えられる。酸化ストレスによる Met 残基の酸化は p53 タンパク質を不活性化させる要因の一つであるかもしれない。

上記とは逆に、四量体形成が p53 タンパク質の翻訳後修飾において必須となる場合も知られている。例えば、ユビキチンリガーゼ (E3) である Mdm2 との結合を阻害する

N末端領域 Ser20 のリン酸化には四量体形成ドメインが必要である²⁹⁾。また、p53 の DNA 結合能を増加させる C 末端領域 Lys382 のアセチル化も、四量体形成できない変異型では起こらない^{6,11)}。これは C 末端領域 Lys320 をアセチル化する酵素 p300 が p53 の四量体にしか結合できないためであると考えられる。さらに、p53 の E3 ユビキチンリガーゼである Pirh2 は p53 の四量体構造を認識し、四量体形成ドメインに結合して p53 をユビキチン化することが明らかになっている³⁰⁾。このため、Pirh2 は四量体を形成している p53 を優先的にユビキチン化することで、活性型 p53 の代謝回転を制御していると考えられている。

四量体形成と翻訳後修飾が相互に影響し合う一方で、これらは細胞内における p53 タンパク質の安定性、転写活性、タンパク質間相互作用にも影響を及ぼす。p53 は極めて半減期が短く、正常細胞では生合成後速やかにユビキチン-プロテアソームによるタンパク質分解を受ける。このため、正常細胞において p53 のタンパク質レベルは非常に低い。ところが、遺伝毒性ストレスに応答して p53 の N 末端側がリン酸化を受けると、Mdm2 と p53 の結合が阻害され、p53 は安定化して機能を発揮する^{31,32)}。また、C 末端領域のアセチル化が p53 の配列特異的 DNA 結合、転写活性を増加させることが明らかとなっている^{33,34)}。さらには、p53 の四量体形成はタンパク質間相互作用にも重要である。翻訳後修飾する酵素のみならず、p53 の核内移行に関わると考えられている S100B や³⁵⁾、Mdm2³⁶⁾、HPV-16 E2³⁷⁾、c-Abl³⁸⁾ との結合も p53 の多量体構造に影響を受けるという報告もされている。このように、細胞内における p53 の機能は様々な要因に関わる複雑な制御を受けているため、*in vitro* における精密な定量的解析が重要になると考えられる。

4. 四量体形成ドメインの変異と四量体構造の安定性

p53 タンパク質をコードしている *TP53* 遺伝子の変異はヒト悪性腫瘍中で最も多く見られる異常である^{24,39)}。欠損型変異やナンセンス変異による不活性化が大部分を占める他のがん抑制遺伝子とは異なり、p53 に見られる変異の大部分 (74%) はミスセンス変異である。p53 に見られる体細胞ミスセンス変異はその 95% 以上が DNA 結合ドメインに見られる (図 5)。一方、生殖細胞系列変異では、四量体形成ドメイン中に存在する Arg337 に最も多くの変異が報告されており、DNA 結合ドメインと四量体形成ドメインには同程度の頻度で変異が存在している。このことから、DNA 結合ドメインと同様に、四量体形成ドメインは p53 の機能発現にとって必須の領域であることがわかる。

Li-Fraumeni 症候群に見られる変異である R337C、R337H、L344P や、悪性腫瘍由来の変異 L330H、G334V、R342P については構造安定性や転写活性などの機能が報告されてい

る。これらの変異体は天然型と比べて四量体構造が著しく不安定化しており、DNA 結合能や転写活性が低下していることが明らかとなっている^{40~43)}。Kriwacki らは、家族性腫瘍症候群の Li-Fraumeni 症候群に見られる p53 変異 R337H の安定性を詳細に解析している⁴²⁾。天然型の四量体構造は pH 5 から 9 の間で安定性が変化しないのに対し、R337H は pH が 7 から 8 に上昇すると大きく不安定化する。この pH 依存性は His 残基のプロトン化によるものであることがわかっている。また、G334V のように四量体構造を不安定化させるだけでなく、生理的 pH でアミロイドを形成する変異も報告されている⁴⁴⁾。334 位 Gly は β ストランドと α ヘリックスを繋ぐターン部位に位置する残基である。変異型ペプチド G334V は、低温条件下で天然型 p53 四量体形成ドメインペプチドと同様の四量体構造を形成するが、生理的 pH、温度条件下では β 構造からなる凝集前駆体へと構造変化し、アミロイド様線維を形成する。天然型および R337H ペプチドも pH 4.0 ではアミロイド様線維を形成することが報告されている⁴⁵⁾。さらに、著者らはシスプラチン耐性卵巣がん細胞 (A2780) から、四量体形成ドメイン変異 K351N を同定し、四量体構造が不安定化していることを見出した⁴⁶⁾。さらに、K351N は転写活性が減少し、シスプラチン処理による細胞質 p53 の減少も見られた。A2780 のシスプラチン誘導アポトーシスは細胞質 p53 に依存することが知られており、A2780 は K351N の四量体構造の不安定化による転写活性の減少および細胞質 p53 の減少によりアポトーシス耐性を獲得していると考えられる。

上記の変異を含め、四量体形成ドメイン中では、現在までに四量体形成ドメイン 31 残基中 24 残基に 49 個のミスセンス変異が報告されている (表 1)³⁹⁾。我々は、これらの変異が p53 の四量体構造に及ぼす影響を網羅的・定量的に解析するため、変異型 p53 四量体形成ドメインペプチドを用いた構造安定性の網羅的解析を行った。まず、変異型ペプチドを化学合成し、ゲルろ過により多量体構造を同定した。その結果、49 種の変異型ペプチド中 5 種のペプチド (L330P、L330R、R337P、R342P、L344P) が四量体を形成できず、単量体の位置に溶出した。一方、3 種のペプチド (F342C、L344R、A347T) は二量体を形成していることが明らかとなった。上記以外の変異型ペプチドは低温・高濃度条件下において天然型と同様に四量体の位置に溶出した。

CD 測定により各ペプチドの四量体構造安定性を定量化した (図 6A)。ほとんどの変異型ペプチドは四量体構造が不安定化しており、中には低温・高濃度条件下においても四量体を形成できず、ランダムコイル状の単量体として存在する変異型ペプチドも存在した。また、上記の疎水性コアを形成する残基の変異により、四量体構造は著しく不安定

化することが明らかとなった。一方、側鎖が溶媒に露出している残基の変異による不安定化効果は小さい傾向にあった。興味深いことに、変異型ペプチドの安定性は天然型とほぼ同程度から非常に不安定なものまで広く分布していた。さらに変異型 p53 の内在性 p53 タンパク質レベルにおける四量体の割合を算出した結果、*in vitro* ではわずかしかな不安定化が見られない変異体でも、四量体の割合は大きく減少することが明らかになった。このことから、四量体構造のわずかな不安定化が p53 の四量体構造に影響を及ぼし、p53 の機能不全へと繋がる可能性が示唆される。すなわち、p53 が機能不全となる際の四量体構造不安定化の閾値は非常に小さいかもしれない (図 6B)。

四量体構造の安定性と p53 の機能との相関を解明するため、現在までに変異型 p53 についての様々な解析が進められている。我々は、生細胞中における p53 の機能を解析するため、緑色蛍光タンパク質 EGFP 融合 p53 タンパク質発現ベクターと p53 応答性プロモーターの下流に赤色蛍光タンパク質 DsRed の遺伝子を組み込んだレポーターベクターを作成した (図 7A)。このベクターを p53 null の H1299 細胞に導入し、緑色蛍光量から p53 タンパク質量を、赤色蛍光量から p53 の転写活性を定量化した⁴⁷⁾。一般に、細胞に発現ベクターをトランスフェクトすると、導入するベクター量を少なくとも内在性レベルに比べて約 10~20 倍量の過剰のタンパク質が発現する。p53 四量体形成は濃度に依存するため、p53 タンパク質が過剰に存在している条件では四量体の割合が増加してしまうと考えられる。このため、内在性レベルの p53 を発現している細胞のみを解析対象とした。その結果、四量体構造が不安定化している変異体では転写活性も低下し、両者の間に強い相関が見られ、細胞内生理的条件に近い濃度において四量体形成が転写活性に必要であることが示された (図 7B)。同様の結果が、酵母発現系を用いた転写活性の解析でも報告されている⁴⁸⁾。

5. p53 四量体構造の安定性制御を介した機能制御

今まで述べてきたように、p53 の四量体形成により転写活性やタンパク質間相互作用が変化する。このため、四量体構造を安定化あるいは不安定化させることにより、p53 の機能を制御することができると考えられる。

p53 四量体形成ドメインや DNA 結合ドメインをターゲットとして、がん治療薬を目指した安定化剤開発が進められている。四量体形成ドメインの点変異による四量体構造の不安定化は、細胞内転写活性を低下させている。このため、変異型四量体構造を安定化させることで p53 の機能回復が可能になると考えられる。Mendoza らは、カリックス[4]アレーンの上部に四つのグアニジウム基を持ち、下部に疎水性のループ構造を持つ化合物を合成した⁴⁸⁾。こ

のカリックス[4]アレーン誘導体は、Li-Fraumeni 症候群に見られる点変異体 R337H に対してペプチドが 50% 変性するときの温度 T_m をおよそ 10°C 上昇させると報告している。¹H-¹⁵N-HSQC 法による NMR 測定により、この化合物中のプラス電荷を持つグアニジウム基が p53 四量体構造の表面に側鎖が露出している Glu346, Glu339 と相互作用し、疎水性のループ構造が p53 四量体構造の疎水性ポケットに入り込むことで変異型 R337H 構造を安定化することが明らかとなっている。この化合物の細胞や動物レベルでの活性に興味を持たれる。また、DNA 結合ドメインの変異体に対する安定化剤も報告されており、それら安定化剤による変異型 p53 の機能修復が示されている^{49~52)}。

p53 の四量体形成については、これまでその安定化について興味を持たれてきたが、四量体形成の阻害による不安定化が重要な意味を持つ例も紹介したい。iPS 細胞は四つの転写因子 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* を導入することで作成することができるが、作成効率は導入した細胞中 5% と非常に低い⁵³⁾。近年、この低い作成効率は、p53 が iPS 細胞誘導の過程を抑制していることが原因であり、p53 null の細胞では iPS 作成効率が 10~20 倍に増加することが明らかとなっている⁵⁾。このことから、p53 機能の一過性の効果的な阻害は、iPS 細胞作成の効率を上昇させると考えられる。著者らは p53 が四量体として機能することに着目し、四量体形成ドメインペプチドとヘテロオリゴマーを形成させることで p53 機能を阻害することを目指している。四量体形成ドメインペプチドを細胞内へ導入するため、protein transduction domain (PTD) であるポリカチオン配列を p53 ペプチドに融合した PTD-p53tet ペプチドを化学合成した。これらのペプチドは細胞内へと移行し、p53 の転写活性を約 60% 阻害することが明らかとなった (図 7C)。この阻害効果は四量体を形成できない変異型ペプチドでは見られなかったことから、PTD-p53tet ペプチドは p53 タンパク質とヘテロ四量体を形成し、転写活性を阻害したものと考えられる。より強い阻害効果を示すペプチドを開発するため、ペプチドの導入効率、ヘテロオリゴマーを優先的に形成するペプチドのスクリーニング等を進める必要があるだろう。

6. お わ り に

p53 は細胞内で厳密にタンパク質量が制御され、機能している。p53 の遺伝毒性ストレスに応答した翻訳後修飾、安定化により p53 の四量体と単量体間の平衡が四量体側にシフトし、p53 はより翻訳後修飾を受けやすくなる。このように、p53 の翻訳後修飾と四量体構造の安定化は相互に影響しあうことで、遺伝毒性ストレスに迅速に応答し、細胞のがん化を抑制していると考えられる (図 8)。

p53 の詳細な制御機構、変異によるがん化機構を解明す

る上で、細胞内 p53 濃度における四量体構造の安定性・翻訳後修飾・機能を定量的に解析することは極めて重要である。このような定量的解析には、容易に多種類・多量のサンプルを得ることができ、様々な測定系に応用することができるペプチドは極めて有用であるといえる。今後は、ペプチドを用いて得られた安定性の結果と全長タンパク質の安定性との比較、およびタンパク質の翻訳後修飾レベル・転写活性などの機能を定量的に解析する必要があるだろう。また、p53 の四量体形成ドメインペプチドにおいて、N 末端および C 末端は模式的にそれぞれ立方体の頂点に位置するという非常にユニークな構造を形成しており、N 末端、C 末端に各種機能分子を立体配置制御的に付加することにより、このペプチドを利用した新規バイオナノマテリアル創製への展開も期待される。

文 献

- Meek, D.W. (2009) *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 714–723.
- Meek, D.W. & Anderson, C.W. (2009) in *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Levine A.J. & Lane D. eds.), pp. 1–16, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Rodier, F., Campisi, J., & Bhaumik, D. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 7475–7484.
- Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., & Miyazono, K. (2009) *Nature*, **460**, 529–533.
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., & Yamanaka, S. (2009) *Nature*, **460**, 1132–1135.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W., & Appella, E. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 2831–2841.
- Maki, C.G. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 16531–16535.
- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., & Prives, C. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 289–300.
- Chene, P. (2001) *Oncogene*, **20**, 2611–2617.
- Warnock, L.J., Knox, A., Mee, T.R., Raines, S.A., & Milner, J. (2008) *Cancer Biol. Ther.*, **7**, 1481–1489.
- Itahana, Y., Ke, H., & Zhang, Y. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 5158–5164.
- Hojo, H. & Aimoto, S. (1991) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 111–117.
- Hojo, H. & Aimoto, S. (1992) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 3055–3063.
- Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Anderson, C.W., Erickson, J.W., Appella, E., & Xie, D. (1997) *Biochemistry*, **36**, 10117–10124.
- Clore, G.M., Ernst, J., Clubb, R., Omichinski, J.G., Kennedy, W.M., Sakaguchi, K., Appella, E., & Gronenborn, A.M. (1995) *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 321–333.
- Clubb, R.T., Omichinski, J.G., Sakaguchi, K., Appella, E., Gronenborn, A.M., & Clore, G.M. (1995) *Protein Sci.*, **4**, 855–862.
- Jeffrey, P.D., Gorina, S., & Pavletich, N.P. (1995) *Science*, **267**, 1498–1502.
- Miller, M., Lubkowski, J., Rao, J.K., Danishefsky, A.T., Omichinski, J.G., Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Appella, E., Gronenborn, A.M., & Clore, G.M. (1996) *FEBS Lett.*, **399**, 166–170.
- Mateu, M.G. & Fersht, A.R. (1998) *EMBO J.*, **17**, 2748–2758.
- Lwin, T.Z., Durant, J.J., & Bashford, D. (2007) *J. Mol. Biol.*, **373**, 1334–1347.
- Mateu, M.G., Sanchez Del Pino, M.M., & Fersht, A.R. (1999) *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 191–198.
- Davison, T.S., Nie, X., Ma, W., Lin, Y., Kay, C., Benchimol, S., & Arrowsmith, C.H. (2001) *J. Mol. Biol.*, **307**, 605–617.
- McCoy, M., Stavridi, E.S., Waterman, J.L., Wiczorek, A.M., Opella, S.J., & Halazonetis, T.D. (1997) *EMBO J.*, **16**, 6230–6236.
- Halazonetis, T.D. & Kandil, A.N. (1993) *EMBO J.*, **12**, 5057–5064.
- Balagurumoorthy, P., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Zambrano, N., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Appella, E., & Harrington, R.E. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 8591–8595.
- Nagaich, A.K., Zhurkin, V.B., Durell, S.R., Jernigan, R.L., Appella, E., & Harrington, R.E. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 1875–1880.
- Rajagopalan, S., Jaulent, A.M., Wells, M., Veprintsev, D.B., & Fersht, A.R. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, 5983–5991.
- Nomura, T., Kamada, R., Ito, I., Chuman, Y., Shimohigashi, Y., & Sakaguchi, K. (2009) *Biopolymers*, **91**, 78–84.
- Shieh, S.Y., Taya, Y., & Prives, C. (1999) *EMBO J.*, **18**, 1815–1823.
- Sheng, Y., Laister, R.C., Lemak, A., Wu, B., Tai, E., Duan, S., Lukin, J., Sunnerhagen, M., Srisailam, S., Karra, M. *et al.* (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 1334–1342.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., & Oren, M. (1997) *Nature*, **387**, 296–299.
- Picksley, S.M. & Lane, D.P. (1993) *BioEssays*, **15**, 689–690.
- Luo, J., Li, M., Tang, Y., Laszkowska, M., Roeder, R.G., & Gu, W. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 2259–2264.
- Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K. G., Halazonetis, T.D., & Berger, S.L. (2001) *Mol. Cell*, **8**, 1243–1254.
- van Dieck, J., Fernandez-Fernandez, M.R., Veprintsev, D.B., & Fersht, A.R. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 13804–13811.
- Lomax, M.E., Barnes, D.M., Gilchrist, R., Picksley, S.M., Varley, J.M., & Camplejohn, R.S. (1997) *Oncogene*, **14**, 1869–1874.
- Massimi, P., Pim, D., Bertoli, C., Bouvard, V., & Banks, L. (1999) *Oncogene*, **18**, 7748–7754.
- Nie, Y., Li, H.H., Bula, C.M., & Liu, X. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 741–748.
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., & Olivier, M. (2007) *Hum. Mutat.*, **28**, 622–629.
- Atz, J., Wagner, P., & Roemer, K. (2000) *J. Cell. Biochem.*, **76**, 572–584.
- Davison, T.S., Yin, P., Nie, E., Kay, C., & Arrowsmith, C.H. (1998) *Oncogene*, **17**, 651–656.
- DiGiammarino, E.L., Lee, A.S., Cadwell, C., Zhang, W., Bothner, B., Ribeiro, R.C., Zambetti, G., & Kriwacki, R.W. (2002) *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 12–16.
- Rollenhagen, C. & Chene, P. (1998) *Int. J. Cancer*, **78**, 372–376.
- Higashimoto, Y., Asanomi, Y., Takakusagi, S., Lewis, M.S., Uosaki, K., Durell, S.R., Anderson, C.W., Appella, E., & Sakaguchi, K. (2006) *Biochemistry*, **45**, 1608–1619.
- Lee, A.S., Galea, C., DiGiammarino, E.L., Jun, B., Murti, G.,

- Ribeiro, R.C., Zambetti, G., Schultz, C.P., & Kriwacki, R.W. (2003) *J. Mol. Biol.*, **327**, 699–709.
- 46) Muscolini, M., Montagni, E., Caristi, S., Nomura, T., Kamada, R., Di Agostino, S., Corazzari, M., Piacentini, M., Blandino, G., Costanzo, A. *et al.* (2009) *Cell Cycle*, **8**, 3396–3405.
- 47) Imagawa, T., Terai, T., Yamada, Y., Kamada, R., & Sakaguchi, K. (2009) *Anal. Biochem.*, **387**, 249–256.
- 48) Kawaguchi, T., Kato, S., Otsuka, K., Watanabe, G., Kumabe, T., Tominaga, T., Yoshimoto, T., & Ishioka, C. (2005) *Oncogene*, **24**, 6976–6981.
- 49) Bykov, V.J., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K.G., & Selivanova, G. (2002) *Nat. Med.*, **8**, 282–288.
- 50) Foster, B.A., Coffey, H.A., Morin, M.J., & Rastinejad, F. (1999) *Science*, **286**, 2507–2510.
- 51) North, S., Pluquet, O., Maurici, D., El-Ghissassi, F., & Hainaut, P. (2002) *Mol. Carcinog.*, **33**, 181–188.
- 52) Selivanova, G., Ryabchenko, L., Jansson, E., Iotsova, V., & Wiman, K.G. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3395–3402.
- 53) Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) *Cell*, **126**, 663–676.
-