

## 学位論文題名

Functional characterization of naturally occurring mutants (P405R and P425L) of p73  $\alpha$  and p73  $\beta$  found in neuroblastoma and lung cancer(神経芽細胞腫と肺癌で見られた自然発生 p73  $\alpha$  と p73  $\beta$  蛋白質の機能解析)

## 学位論文内容の要旨

新規癌抑制蛋白質 p73 は、構造的にも機能的にも p53 に類似しており、多くの p53 標的遺伝子のプロモータを活性化し、アポトーシス誘導能を持っている。また、p73 は p53 と同様に N 末端より、転写活性化部位、DNA 結合部位、4量体形成部位を持ち、さらにその C 末端側には p73 に特異的な領域が存在している。最近、我々は p73 の C 末端に存在するグルタミン、プロリンに富む領域を用いた実験で、この領域に転写活性化能が存在することを発見した。さらに、p73 はヒトの癌ではほとんど変異が発見されていないが、我々は神経芽細胞腫と肺癌でアミノ酸置換 (P405R:405 のプロリンがアルギニンへ置換、P425L:425 のプロリンがロイシンに置換) を伴う2種類の p73 自然発生源突然変異を発見した。興味深いことに、これら2種類の変異は、p73 の C 末端の転写活性化能を低下させることが、これら2種類の断片を用いた実験から示唆された。本研究では、上記2種類の変異をそれぞれ含む、全長 p73  $\alpha$ 、p73  $\beta$  を構築し、p73 の細胞内局在、転写活性化能、DNA 結合能、細胞増殖抑制能に対する、これら2種類の変異の効果について検討した。

まず、ウサギの網状赤血球の系を用いた実験と、ヒト293細胞を用いた実験で、これら2種類の変異を含む p73  $\alpha$  および p73  $\beta$  は、野生株の p73  $\alpha$  および p73  $\beta$  と同様に安定に存在することが確認された。p73 変異体の細胞内局在について、ヒト293細胞を使い免疫染色を用いて調べた。その結果は、変異体を含む p73  $\alpha$ 、p73  $\beta$  は、いずれも野生株 p73 と同様に核に局在していることが認められた。したがって、2種類の変異は p73 の細胞内局在、および安定性には影響を及ぼさないことが示唆された。次に、p53 欠損細胞である SAOS-2 細胞を用いて、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法で転写活性化能を調べた。プロモータは p53 標的遺伝子である Bax、MDM2、p21 に由来するものを使用した。その結果は、p73  $\alpha$  の P425L 変異体のみが3種類のプロモータの転写活性化に対して抑制的に働き、p73  $\alpha$  の P405R 変異体や p73  $\beta$  の2種類の変異体では、転写活性化能に対して野生株 p73 と有意な差が見られなかった。また、p73 変異体の DNA 結合能を、p53 標的配列を用いたゲルシフト法で検討したところ、2種類の変異は、p73  $\alpha$ 、p73  $\beta$  の DNA 結合能に対しては影響を及ぼさないことが判明した(データは示していない)。したがって、3種類のプロモータに対する転写活性化能の変化は DNA 結合能の変化を反映したもので

はないことが示唆された。さらに、p73 変異体の SAOS-2 細胞に対する細胞増殖抑制能を、コロニーフォーメーション法により検討した。その結果、先ほどの転写活性化能の抑制が観察された p73 変異体 (P425L) のみに、野生株 p73 に比較してより多くの薬剤耐性コロニーが認められ、他の変異体では有意な差が認められなかった。したがって、P425L 変異は p73  $\alpha$  のアポトーシス誘導能を抑制する効果を持つことが示唆された。以上の結果より、実際の臨床材料である、神経芽細胞腫より発見された自然発生 p73 変異のうちの一つである P425L 変異は、p73 の機能の喪失を引き起こす変異であると示唆される。また、これらのことから、P425L を含む p73 に特異的な C 末端は、p73 の転写活性化能のみならず、細胞増殖抑制能に対し重要な役割を演じていると推測される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也  
副 査 教 授 藤 堂 省  
副 査 教 授 菊 池 九二三  
副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

## Functional characterization of naturally occurring mutants (P405R and P425L) of p73 $\alpha$ and p73 $\beta$ found in neuroblastoma and lung cancer

(神経芽細胞腫と肺癌で見られた自然発生 p73  $\alpha$  と p73  $\beta$  蛋白質の機能解析)

新規癌抑制蛋白質 p73 は、構造的にも機能的にも p53 に類似しており、多くの p53 標的遺伝子のプロモータを活性化し、アポトーシス誘導能を持っている。また、p73 は p53 と同様に N 末端より、転写活性化部位、DNA 結合部位、4 量体形成部位を持ち、さらにその C 末端側には p73 に特異的な領域が存在している。最近、我々は p73 の C 末端に存在するグルタミン、プロリンに富む領域を用いた実験で、この領域に転写活性化能が存在することを発見した。さらに、p73 はヒトの癌ではほとんど変異が発見されていないが、我々は神経芽細胞腫と肺癌でアミノ酸置換 (P405R : 405 のプロリンがアルギニンへ置換、P425L : 425 のプロリンがロイシンに置換) を伴う 2 種類の p73 自然発生点突然変異を発見した。本研究では、上記 2 種類の変異をそれぞれ含む、全長 p73  $\alpha$ 、p73  $\beta$  を構築し、p73 の細胞内局在、転写活性化能、DNA 結合能、細胞増殖抑制能に対する、これら 2 種類の変異の効果について検討した。

まず、ウサギの網状赤血球の系を用いた実験と、ヒト 293 細胞を用いた実験で、これら 2 種類の変異を含む p73  $\alpha$  および p73  $\beta$  は、野生株の p73  $\alpha$  および p73  $\beta$  と同様に安定に存在することが確認された。p73 変異体の細胞内局在について、ヒト 293 細胞を使い免疫染色を用いて調べた。その結果、変異を含む p73  $\alpha$ 、p73  $\beta$  は、いずれも野生株 p73 と同様に核に局在していることが認められた。したがって、2 種類の変異は p73 の細胞内局在、および安定性には影響を及ぼさないことが示唆された。次に、p53 欠損細胞である SAOS-2 細胞を用いて、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法で転写活性化能を調べた。プロモータは p53 標的遺伝子である Bax、MDM2、p21 に由来するものを使用した。その結果は、p73  $\alpha$  の P425L 変異体のみが 3 種類のプロモータの転写活性化に対して抑制的に働き、p73  $\alpha$  の P405R 変異体や p73  $\beta$  の 2 種類の変異体 (p405R と p425L) では、転写活性化能に対して野生株 p73 と有意な差が見られなかった。また、p73 変異体の DNA 結合能を、p53 標的配列を用いたゲルシフト法で検討したところ、2

種類の変異は、p73 $\alpha$ 、p73 $\beta$ のDNA結合能に対しては影響を及ぼさないことが判明した（データは示していない）。したがって、3種類のプロモータに対する転写活性化能の変化はDNA結合能の変化を反映したものではないことが示唆された。さらに、p73変異体のSAOS-2細胞に対する細胞増殖抑制能を、コロニーフォーメーション法により検討した。その結果、先ほどの転写活性化能の抑制が観察されたp73変異体（P425L）のみに、野生株p73に比較してより多くの薬剤耐性コロニーが認められ、他の変異体では有意な差が認められなかった。したがって、P425L変異はp73 $\alpha$ のアポトーシス誘導能を抑制する効果を持つことが示唆された。以上の結果より、実際の臨床材料である、神経芽細胞腫より発見された自然発生p73変異のうちの1つであるP425L変異は、p73の機能の喪失を引き起こす変異であると示唆される。また、これらのことから、P425Lを含むp73に特異的なC末端は、p73の転写活性化能のみならず、細胞増殖抑制能に対し重要な役割を演じていると推測された。

審査にあたって菊池教授から、P425点突然変異によるp73の転写活性化能の低下は4量体形成が関係していないか、また、ドミナントネガティブは関係していないのかという質問があり、申請者は各種文献や自身のデータから、4量体形成に関しては恐らくは関係していないことを説明、ドミナントネガティブに付いてもそのような効果はないことを説明した。浅香教授からは2種類の突然変異発見時の解析についてと、臨床応用についての質問があった。申請者は発見したのは自分自身ではなく、今回の実験はその機能解析であることを説明した上で、発見時の文献から分かる範囲で説明した。臨床応用については、p73より下流のタンパクについて明確に分かっていないなど現時点においてはp53のように癌治療に応用はできないが、最近の報告例より、今後中枢神経の発生に関する疾患の治療に応用される可能性があることを説明した。藤堂教授からは癌の悪性度と変異の発見される頻度についてと、P425L変異が見つかった症例について何か特徴はあったのかと質問があり、申請者はp73の突然変異は今回使用した2種類しか発見されておらず悪性度との関係は分からなかったこと、また変異が見つかった症例の臨床的特徴については、吟味はしたが症例数が2例しかなく、特別な特徴は分からなかったことを説明した。守内教授からは今回の2つの変異周囲で人工的に変異を作りその機能を見る実験はしなかったのか、ウェスタンブロットの結果でバンドが2本にみえること、p73は今後oncology上価値があるのかについて質問があり、申請者は人工の変異を使う実験についてはやっているが結果が出ていないこと、2本鎖についてはリン酸化されているものも一緒に見ていること、oncology上の価値については今後下流のタンパクが分かってくれば価値があることを説明した。

この論文はp73の機能である転写活性化能と細胞増殖抑制能に対する2つの点突然変異の影響を明らかにし、p73のカルボキシ末端がp73の生物学的機能の制御において重要な役割を演じており、P425L変異がp73 $\alpha$ における機能低下の原因となる変異の可能性を明らかにした点で高く評価され、今後さらなるp73の機能解析が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位など併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。