

放射線応答と発癌における変異 p53 の機能解析

岡市協生、奥村 寛

p53 は、癌抑制遺伝子であるが、その機能についてはまだ分からないことが多い。p53 遺伝子はさまざまな癌細胞において約50%の割合で変異している。また、その変異部位は、ホットスポットと呼ばれる175, 245, 248, 249, 273, 282のアミノ酸部位を含めて、p53の中央部分にあるDNA結合領域に広く分布している。これらの変異が癌細胞で見つかる頻度は、変異部位によって異なっており、このことが変異部位によって癌への寄与度が異なることを暗示している。また、これらの変異p53遺伝子を持つ細胞は、放射線に対する感受性が変化していることが報告されている。そこで、ヒト癌細胞で報告されている16種類の変異p53遺伝子を細胞に導入して、細胞の放射線感受性とp53の変異部位とにどのような相関があるかを調べた。

次に、p53がリン酸化やアセチル化などにより修飾されて活性化したり安定化したりすることが報告されているが、その機構については矛盾する点も多く、解明されているとは言い難い。さらに、これらの部位での変異が癌細胞で見つからないことも、疑問の残る点である。そこで、すでに報告がある23ヶ所でのp53のリン酸化部位とアセチル化部位に変異を持つp53を作成して、その機構を解明しようとした。

成 果

1. 癌細胞で見つかる p53 の変異

今までヒトの癌細胞において報告されているp53の変異のうち、同じ部位で3例以上報告されている変異を75種類作成した(表1)。

これらの遺伝子をp53遺伝子欠失細胞であるSaos-2に導入しようとしたが、その導入効率は低く、導入できない変異p53遺伝子も多かった。そこで、p3'SS調節ベクターをあらかじめ導入してLacリプレッサーを多量に合成しているSaos-2細胞に、変異p53遺伝子をつないだpOPI3発現ベクターを導入し、IPTG存在下でp53タンパク質が誘導できる系を用いた。このことにより、合計16種類の変異p53遺伝子導入細胞を得ることができた。そこで、ガンマ線照射装置で6Gy照射して各細胞の放射線感受性を調べた。放射線感受性は、照射後4週間培養した後できたコロニーをギムザ染色してコロニー数を測定した。1点につき3枚のシャーレを使い、3回以上実験を繰り返した。

親株であるSaos-2細胞と同等に放射線抵抗性が、より放射線に抵抗性となったものは5種類あった。このうちの4種類はホットスポット部位であり、今回実験に用いたホットスポット変異は、全て抵抗性に分類された。

一方、正常p53遺伝子導入細胞と同等に放射線感受性が、より放射線に感受性になったものは4種類あった。また、これらの中間の放射線感受性を示したものは7種類であった。この結果より、細胞の放射線感受性がp53の変異部位により変化することが明らかになった。

さらに、DNAチップを用いて、親株であるSaos-2細胞と、正常p53遺伝子、G245SとC277Fの変異p53遺伝子を導入した各細胞における遺伝子発現調節を、3Gyの線を照射後24時間培養して調べた。p53遺伝子を欠損しているSaos-2細胞では、p53関連遺伝子の誘導は見られなかったが、正常p53遺伝子導入細胞では、多くのp53関連遺伝子で、2倍以上の発現誘導が見られた。放射線抵抗性を示すホットスポット部位のG245S変異遺伝子導入細胞では、正常p53導入細胞で見られた遺伝子の発現誘導はほとんど見られなかったが、異なる遺伝子が誘導されていた。中間の放射線感受性を示すC277F変異遺伝子導入細胞では、正常p53遺伝子導入細胞で見られた遺伝子の誘導が一部で観察されたが、その他の遺伝子では誘導が見られなかった。また、C277F変異遺伝子導入細胞では独自の遺伝子誘導も観察されなかった。

2. p53 修飾部位での変異

報告されているp53のリン酸化とアセチル化の23部位

表1 作成した癌細胞で見つかる p53 の変異

S121F, T123A, L130V, K132R, C135Y, A138V, C141Y, V143A, P151S, P152S, G154V, V157F, R158L, A159V, M160I, Y163C, K164E, Q167R, H168R, V172D, V173M, R175H, C176F, P177R, H179Y, R181H, H193R, L194R, I195T, V197G, D208V, T211I, H214R, V216M, Y220C, E221D, Y234C, N235S, Y236C, M237I, C238Y, N239S, S241F, C242F, G244C, G245S, M246V, R248W, P250L, I251S, I255F, E258K, L265P, G266V, R267W, F270L, V272M, R273H, V274F, C275Y, A276P, C277F, P278L, R280T, D281E, R282W, E285K, E286K, E287K, G293W, P300S, S303N, K305M, S313R, L330H

(下線はホットスポット変異を示している。 合計75種類)

に変異を人工的に作り、合計28種類の変異遺伝子を作成してH1299細胞に導入した(表2)。

表2 作成したp53修飾部位での変異

<p><N末> S6A, S9A, S15A, S15D, S16E, T18A, S20A, S20D, S33A, S37A, S37D, S46A, T81A, S90A <C末> S315A, K320A, K370A, S371A, K372A, K373A, S376A, S376D, S378A, S378D, 381A, K382A, K386A, S392A</p>
--

まず、セリン(S)をアスパラギン酸(D)に置換することにより擬似的にリン酸化した状態になる変異S15DとS20Dを導入した細胞について検討した。S15D導入細胞は強い細胞増殖抑制能を示したが、S20D導入細胞では正常p53遺伝子導入細胞で見られたような細胞増殖抑制は示さなかった。そこで、DNAチップの技法を用いて遺伝子発現を調べた。S15D導入細胞では、Waf-1や一般的なp53下流遺伝子の誘導は観察されなかったが、細胞増殖やシグナル伝達に関わる遺伝子群の誘導と抑制が観察された。S20D導入細胞ではCDK2が2倍以上誘導されることにより細胞周期停止がキャンセルされていて、アポトーシス関連の遺伝子の誘導も見られなかった。

ま と め

1. 癌細胞で見つかるp53の変異

p53遺伝子の特定の部位に人工的に変異を導入して、どの部位で変異すると細胞の放射線感受性が変化するかを調べたところ、p53の変異部位によって放射線感受性がそれぞれ異なることが分かった。この結果を今までの報告に照らし合わせて考えてみると、p53が突然変異すると放射線に耐性になるとする報告が多いのは、ホットスポット部位での変異が放射線耐性をもたらすとする今回の結果とよく合っていることが分かった。各部位でのp53の変異の頻度は、さまざまな癌細胞で見つかる頻度であるので、p53の変異部位は放射線感受性だけでなく、癌になり易いかどうかにも関与していると考えられる。

癌細胞で多く見つかるホットスポット部位での変異細胞は、全て放射線抵抗性になったことより、癌になりやすい性質は放射線感受性とも強く相関していることが伺える。つまり、発癌機構と放射線によるDNA損傷修復機構やアポトーシス誘導機構とは密接な関連があると考えられる。一方、放射線感受性になった変異細胞や、放射線感受性が中間を示した変異細胞は、癌細胞で見つかる頻度は比較的少ないものが多いが、放射線抵抗性を示した変異細胞に比べて、はっきりとした傾向は見られなかった。このことより、放射線感受性の変異細胞や、放射線感受性が中間を示した変異細胞では、癌を抑制するためのp53の機能が一部分失われたことにより癌になりやすくなったが、残りの部分の機能を維持しているために、放射線の感受性が残っているであろうと考えられた。

DNAチップによる検索で、各変異p53遺伝子導入細胞における、遺伝子発現誘導能の変化の様子を調べたところ、p53の変異部位によって誘導できる遺伝子が異なっており、ホットスポット部位での変異では、p53が持っていた遺伝子誘導機能は、ほとんどが失われていた。しかし、正常p53が誘導していなかった遺伝子が、ホットスポット部位での変異細胞では誘導されており、その中には発癌により誘導される遺伝子の誘導が見られた。このことより、ホットスポット部位での変異は、ただ単にp53の機能が失われるだけでなく、新たに発癌に有利になる機能が獲得された(Gain of function)ことが、癌細胞の中で非常に頻度が高く見つかる原因であろうと考えられた。

一方、放射線に中間の感受性を示す変異細胞では、正常p53で誘導される遺伝子の一部分は誘導されなくなっていたが、残りの遺伝子は誘導することができ、放射線によるDNA損傷修復機構やアポトーシス誘導機能は一部分残っていた。しかし、ホットスポット部位のように新たに機能を獲得するようなことはなかった。

今後、p53の各部位での変異がどの程度放射線や抗癌剤に対する感受性を変化させるのかが詳しく分かれば、p53の変異部位ごとに効率のよい癌治療法を使い分けることができると思われる。

2. p53修飾部位での変異

p53のセリン15と20部位を変異したS15DとS20Dの導入細胞を用いた実験より、放射線照射による細胞増殖停止と、p53タンパク質の単独部位でのリン酸化修飾による細胞増殖停止とは、異なった経路により行われていることが分かった。特に、セリン20部位単独のリン酸化により細胞増殖阻害がキャンセルされることが明らかになったが、これは今まで考えられていたリン酸化によるp53の活性化・安定化機構とは異なっており、p53のリン酸化による調節機構に新たな見方を導入することができたと考えられる。

DNAチップを用いてS15DとS20Dの変異p53による誘導遺伝子を検索したところ、細胞周期やアポトーシス誘導関連遺伝子の発現誘導が変化していた。しかし、セリン15や20が擬似的にリン酸化されても、放射線照射によって誘導される典型的な遺伝子の誘導は見られなかった。このことより、放射線照射によるp53の活性化はセリン15や20のリン酸化だけでなく他の部位のリン酸化やその他の修飾や、p53以外のタンパク質の関与が必要であると考えられる。不思議なことに、p53の修飾部位での変異は癌細胞ではほとんど見つからない。今回の研究から、p53の修飾部位での単独の修飾では癌抑制機能を失わず、複数個所での修飾が合わさらないと癌抑制やDNA修復などの機構に影響を与えないことが、癌細胞でp53の修飾部位での点突然変異が見出せない理由ではないかと考えられる。このことは、癌治療にも重要な知見であると考えられる。