

氏名・(本籍)	青山 哲也 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第91号
学位授与の日付	平成13年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 1 項該当 (課程博士)
学位論文題目	酵母を用いたp53ルシフェラーゼアッセイの開発
論文審査委員	主査 教授 有 末 眞 副査 教授 賀 来 亨 副査 教授 田 隈 泰 信

論文内容の要旨

【目 的】

p53はヒト癌で最も高頻度の変異が認められる癌抑制遺伝子であり、発癌の抑制に重要な役割を果たす。p53はDNAの傷害、低酸素状態などストレスや、癌遺伝子の活性化などにより活性化され、活性化p53は転写因子としてBaxやp21などの下流のターゲット遺伝子の転写を制御することにより、アポトーシスや細胞周期停止などの生物学的反応を細胞に引き起こす機能を通じ、発癌を抑えている。p53変異は、SSCPやp53遺伝子の塩基配列をシーケンス、さらには、最近開発されたp53の変異に基づく機能異常を酵母のコロニーの色彩の変化 (正常: 白コロニー, 異常: 赤コロニー) で判別する高感度な酵母p53機能アッセイにて解析されている。しかし、酵母p53機能アッセイでは、レポータを駆動するp53結合配列として本来は遺伝子のプロモーターではないRGC配列を用いているため、実際のヒト染色体上のp53下流のターゲット遺伝子への変異p53の転写活性化能とは必ずしも一致せず、また、それぞれの変異型p53の転写活性が定量的に評価できない問題点が存在する。そこで、変異型p53の転写活性を定量的に評価するために酵母を用いた新しいp53ルシフェラーゼアッセイの開発をするために、本研究ではヒト自然プロモーターが酵母内で機能するという仮説をヒトBaxおよびp21の実際のプロモーター配列にて実証するとともに、野生型および変異型p52, p53ホモログであるp73の転写活性化能を詳細に検討するアッセイシステムを構築した。

【方法と材料】

ヒトp21プロモーター: ホタル・ルシフェラーゼ, Bax

プロモーター: ホタル・ルシフェラーゼそれぞれのリポーターコンストラクトをYlpベクターpRS406 (URA3マーカー) に組み込みURA3マーカー内部で切断線形成、酵母株yPH857 (genotype MATa ura3-53 lys2-801 ade2-101 his30D200 trp1- Δ 63 leu2- Δ 1 cyh2R) に導入し、Uracil非添加SD培地にて組換え酵母を選択、Luciferase特異的プライマーを用いたPCRにて目的コンストラクトの組み込みを確認した。それぞれをyMTbax-luc, yMTp21-lucと命名した。yMTbax-luc, yMTp21-lucにヒトp53発現ベクターpLS76 (LEU2マーカー) を導入し、ウラシル・ロイシン非添加SD培地にて培養し、得たコロニーをアデニン添加YPD培地にて増菌、この回収ペレットをガラスビーズ粉砕法にて蛋白を抽出した。蛋白を1 μ g/mlに調整し20 μ lをルシフェラーゼ活性測定に供した。この結果、ルシフェラーゼp53発現によるルシフェラーゼ活性発現を認め、酵母内でBax, p21ヒト自然プロモーターが機能することが示された。次に、ルシフェラーゼ活性を内部コントロールに対する比活性として測定するため、さらに酵母内野生型p53発現ベクターpLS76にウミホタル (Renilla) ルシフェラーゼを組み込むために、ウミホタル・ルシフェラーゼcDNAをHindIIIとEag Iにてp53部分を除去したpLS76に組み込み、これを鋳型にしてウミホタル・ルシフェラーゼ: CYC1ターミネーターを一塊として両端にBgl II配列をつけ増幅し、クローニングした。このBgl IIフラグメントを、あらかじめLEU2とCEN/ARS間に変異導入したBgl II部位に挿入し、pLS76Rとした。さらにp53の第174-179塩基AGGTCCをAGGCCTに変異させ、Stu Iの認識配列を入れpLS76RSと命名した。次いでpLS76RSを変異p53配列を酵母内相同組換えにより簡便に挿入するためにStu Iでp53の174

から1037塩基を切り出した。さらに、相同組換えにてQ168, L197, Q248の変異型p53を組み込んだpLS76RSも作成した。PLS76Rのp53部分をp73 α , p73 β に置換し, p73 α , p73 β をyMTbax-luc, yMTp21-lucに導入し, 野生型p53と変異型p53でのホタル・ルシフェラーゼの転写活性化能をウミホタル・ルシフェラーゼ発光度で補正し検討した。その結果, 野生型p53と比較して酵母p53機能アッセイにおいてピンクコロニーを形成するQ168, L197の変異型p53は60%程度, 赤コロニーを形成するQ248の変異型p53はほぼ0%の比活性をyMTbax-luc, yMTp21-lucに共に示した。p73 α , p73 β の活性は, yMTp21-lucではp73 α は野生型p53の80%, p73 β は300%の比活性を示し, yMTbax-lucではp73 α は野生型p53の150%, p73 β は250%の比活性を示

し, 哺乳動物内での報告された転写活性と矛盾しない値を示した。

[考 察]

本研究で開発した酵母ルシフェラーゼアッセイは変異型p53であるQ168, L197, Q248の転写活性化能を野生型p53と比較して正しく評価することができた。また, p53ホモログであるp73 α , p73 β の転写活性の変化もBaxおよびp21プロモータ特異的に評価することが可能であった。本アッセイは, 様々なp53変異体の転写活性を評価できるとともに, 酵母内には他の遺伝子を複数発現させ得ることから, p53やp53ホモログに相互作用し, 転写活性を調節する因子の解析に利用が期待される。

学位論文審査の要旨

p53は癌で最も最頻度に変異が認められる癌抑制遺伝子であり, 発癌の抑制に重要な役割を果たす。口腔癌をはじめ腫瘍組織からは, さまざまな変異p53が同定されているが, そのターゲット遺伝子への転写活性化能については多くの場合多大な労力と時間が必要なため検討されていない。そこで申請者は, 大量の変異p53サンプルの転写活性化能を簡便に定量し, 評価できる酵母を用いた新しいp53ルシフェラーゼアッセイの開発を試みた。

ヒトp21プロモーター：ホタル・ルシフェラーゼ。およびBaxプロモーター：ホタル・ルシフェラーゼ。それぞれを酵母染色体に組み込み, それぞれの酵母内でヒトp53を発現させ, ルシフェラーゼ活性の測定を行った。結果, p53発現によるルシフェラーゼの転写の促進を認め, 酵母内でBax, p21ヒト自然プロモーターが機能することが示された。さらに酵母内相同組み換えを用いてQ168, L197, Q248の変異p53発現ベクターを簡便に作成できた。また, 酵母内p53発現ベクターのp53部分をp73 α , p73 β に置換し, p73 α , p73 β 発現ベクターも作成した。これらをBax, p21レポーター酵母にそれぞれ導入し, 変異型p53, p73 α , p73 β についてルシフェラーゼアッセイを行った。

結果, 野生型p53と比較してQ168, L197は, 60%程度, Q248はほぼ0%の比活性をBax, p21レポーター共に示した。p73 α , p73 β の活性は, p21レポーターではp73 α は野生型p53の80%, p73 β は300%の比活性を示し, Baxレポーターではp73 α は野生型p53の150%, p73 β は250%の比活性を示した。

本研究により申請者は, p53の反応性のヒトプロモーターが酵母内で転写活性をもつことを証明し, p53のBaxさらにp21への転写活性を定量的に解析する酵母p53ルシフェラーゼアッセイを確立した。さらに, 酵母の特徴である相同組み換えを利用して発現ベクターを作成することができ, 酵母p53機能アッセイで同定された多くの変異サンプルを簡便に解析可能であることが示された。

以上の結果より, 本論文は, 癌抑制遺伝子p53の変異における転写活性を定量的に解析する新しいアッセイの開発という点で意義があり, p53の機能の解析に寄与するところ大であり, 審査の結果, 学位授与に値すると判定した。