

奨励金No.1552

がん抑制タンパク質 p53 が形成するアミロイドに基づいた がん診断法開発

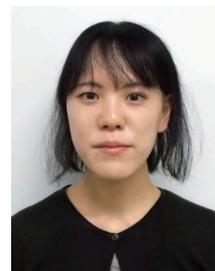
日比野 絵美

国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学大学院創薬科学研究科 助教

Development of cancer diagnosis based on amyloid of tumor suppressor protein p53

Emi Hibino

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University, Tokai National Higher Education
and Research System, Assistant Professor



がん抑制タンパク質 p53 は、細胞のがん化を防ぐ非常に重要なタンパク質である。p53 は機能喪失につながる、構造と性質の異なる二種類の凝集体（アモルファス凝集体とアミロイド凝集体）を同時に形成するが、いまだ不明な点が多い。本研究の目的は、p53 のアミロイド凝集体の性質を明らかにすること、p53 の2種類の凝集を抑制する化合物を見出すことである。その結果、既存の検出法よりも精度が高い p53 アミロイド検出ツールが作製できた。さらに、アモルファス凝集・アミロイド凝集を抑制する化合物を見出すことに成功した。

The tumor suppressor protein p53 is a very important protein that prevents cells from turning cancerous. p53 forms two types of aggregates, amorphous aggregates and amyloid aggregates, with different structures and properties that lead to loss of function, but there are still many unclear points. The aims of our study were to clarify the properties of p53 amyloid aggregates and to identify compounds that inhibit the two types of aggregation of p53. As a result, a p53 amyloid detection tool with higher accuracy than existing detection methods was developed. Furthermore, a compound that inhibits both amorphous aggregation and amyloid aggregation was successfully identified.

1. 研究内容

1.1 背景

がん抑制タンパク質 p53 は、DNAがダメージを受けた際、そのダメージによる細胞のがん化を防ぐ転写因子である。がん化抑制の作用は非常に高く、がんの約半数で p53 に変異が見られることからその効果の高さが窺える。よって、p53 の機能保持ががん予防・がん治療につながる。ただ、p53 はがん治療の主要なターゲットの一つであるにもかかわらず、p53 をターゲットにした治療法がほとんど確立されていない。その理由の一つに、p53 の凝集体に関する理解がほとんど進んでいないことが挙げられる。p53 は構造と性質の異なる

二種類の凝集体（アモルファス凝集体とアミロイド凝集体）が同時に生成してしまうが、これまで混合状態で解析されてきた。申請者は、p53 の凝集方法として広く採用されている方法では、大半をアモルファス凝集体が占めることを突き止めた。すなわち、これまで p53 アミロイドとして解析されてきた凝集体は大半がアミロイドではなかった可能性が高いため、改めて解析することが必要ということである。さらに、非常に簡便な方法でアミロイド凝集体を作製する方法を発見した。

我々は、p53 のアミロイド凝集体の性質を明らかにすることに加え、p53 のアミロイド凝集体・アモルファス凝集体のいずれもを抑制する化合物

を見出すことを目的に、本研究を実施した。

1.2 方法

p53 DNA 結合ドメイン (p53-DBD) は大腸菌大量発現系にて調製・精製したものを使用した。p53-DBD は基本的には終濃度 4 μ M となるように調製し、37°C で 1 時間インキュベートすることで凝集させた。ヒトがん細胞としては乳がん細胞株の一種である MCF-7 を用い、ヒトがん組織としては乳がん組織を使用した。p53-DBD アミロイドに対する抗体は、抗原となる p53-DBD アミロイドを調製後、抗体の作製は外部委託した。得られた血清を精製し、抗体性能のバリデーションはドットプロットならびに蛍光細胞免疫染色により実施した。

1.3 結果・考察

1.3.1 p53-DBD アミロイドの解析

我々が見出した、アミロイドを作製する方法に基づいて調製し、アミロイドの分析を行った。透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察の結果、プロトフィブリル様の形態であることが明らかとなった。続いて、本法で作製した p53-DBD アミロイドを抗原として作製したウサギポリクローナル抗体を用いて、これらの凝集体の検出を試みたところ、想定通り p53-DBD アミロイドを強く認識することが判明した。さらにこの抗体を用いて、ヒトがん細胞を蛍光免疫染色したところ、顆粒状の染色像が得られることが判明した。p53 のアミロイドは、ア

ミロイド全般に用いられる A11 抗体および OC 抗体にて検出されることが多い。我々の作製した p53-DBD アミロイド抗体では、A11 抗体や OC 抗体で検出されたのと同様の染色像であった。さらに、ヒトがん組織でも蛍光免疫染色したところ、興味深いことに A11 抗体や OC 抗体では染色されなかったが p53-DBD アミロイド抗体でのみ顆粒状の染色が見られた (図 1)。このことから、これまで見逃されていた p53-DBD アミロイドの存在が示唆された。

1.3.2 p53-DBD 凝集抑制法の確立

さらに我々は、p53-DBD の 2 種類の凝集の同時抑制を達成するため、スクリーニング系の構築とラボスケールでのミニスクリーニングを実施した。凝集抑制の報告がよくなされるフラボノイド類を対象にスクリーニング実験を実施した結果、バイカレインが p53-DBD のアミロイド凝集・アモルファス凝集のいずれをも抑制することが見出された。バイカレインは抗がん作用が報告されている、生薬に含まれるフラボノイドの一種である。TEM 観察などさらなる解析を進めた結果、バイカレインは p53-DBD の凝集を抑制する代わりに、また別の高次多量体の形成を、バイカレイン濃度依存的に誘導していることが判明した (図 2)。この時、興味深いことに、p53 は凝集体を形成する際は構造転移を伴うが、高次多量体を形成する際は構造転移を伴わないことが判明した。さらにバイカレインを曝露したヒトがん細胞を解析した。イムノ

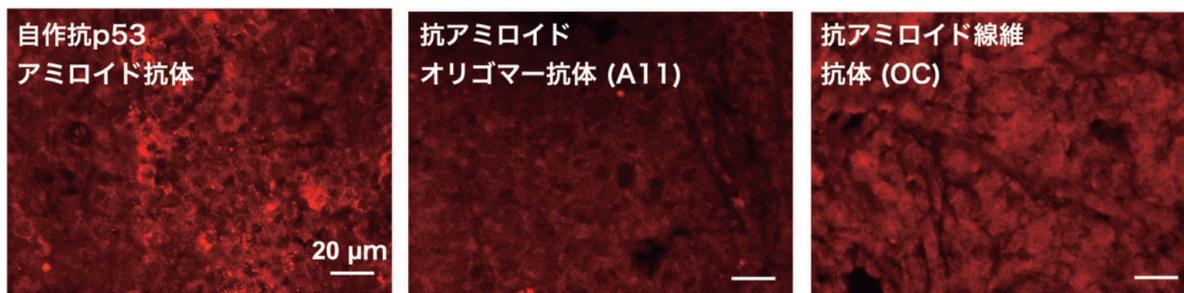


図 1. ヒトがん組織の各種抗体を用いた蛍光免疫染色

ブロット等から p53 の発現量が増加していること、p53 の分解が抑制されていることが確認され、さらに RNA-seq 解析により p53 シグナル経路が活性化していることが判明した。このことから、バイカレインは p53 を多量体形成に導くことで p53 の凝集を抑制するメカニズムが示唆された。

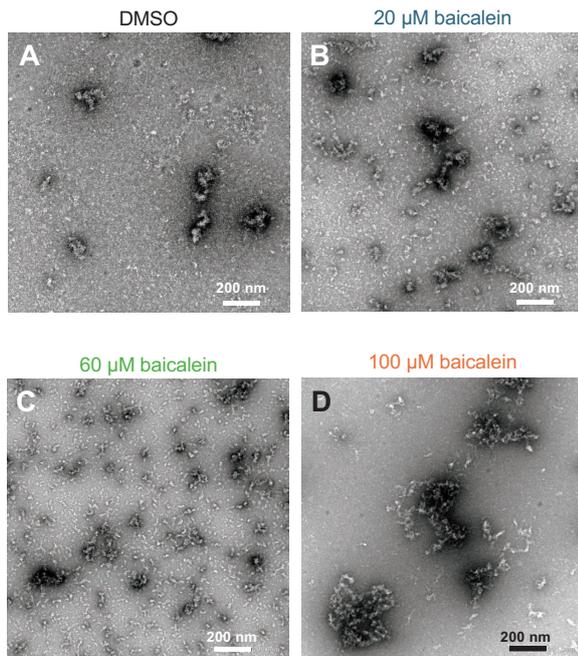


図2. バイカレイン濃度依存的に形成される p53-DBD の高次多量体の TEM 観察像

1.4 まとめ

p53 のアミロイドを検出するツールの作製ならびにバリデーションを進めたことで、既存の検出方法よりも精度が高いことが示唆された。さらに、アモルファス凝集・アミロイド凝集を抑制することで p53 の活性化が見られたことから、今後はこれらの研究をさらに発展させることで、がん治療薬、がん予防薬の開発をさらに進展させる。

2. 発表（研究成果の発表）

- 1) 日比野 絵美、土方 礼嗣、天野 剛志、廣明 秀一
がん抑制タンパク質 p53 が形成する凝集体の調製と分析 Preparation and analysis of aggregates formed by the tumor suppressor protein p53

第 61 回 日本生物物理学会年会（名古屋、2023 年）

- 2) Hibino E, Hijikata R, Tenno T, Hiroaki H.
The function of multiple aggregates formed by the tumor suppressor protein p53
IUPAB2024 (Kyoto, 2024 年)

- 3) 日比野 絵美、土方 礼嗣、山口 真稔、合田 名都子、天野 剛志、廣明 秀一
p53 および SARS-CoV2 における異常凝集体の分析

第 15 回 タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会（オンライン、2024 年）

- 4) 日比野 絵美、土方 礼嗣、山口 真稔、天野 剛志、合田 名都子、廣明 秀一

がんならびに long-COVID 関連タンパク質の凝集解析

日本農芸化学会 2025 年度札幌大会（札幌、2025 年）

- 5) 日比野 絵美、土方 礼嗣、天野 剛志、廣明 秀一
がん抑制タンパク質 p53 の凝集体形成制御法の確立

日本薬学会第 145 年会（福岡、2025 年）