

アフリカツメガエル卵母細胞におけるDNA修復並びに複製への p 5 3 の関与に関する研究

A possible role of p53 in *Xenopus laevis* in DNA repair and replication.

熊本工業大学, 応用微生物工学科, 講師, 小田直子

Research associate, Dept. of Applied Microbial Technol.,
Kumamoto Institute of Technology.

Abstract- p53 acts as a transcriptional activator and repressor, but recent evidence suggests that some of its biological functions may not depend on transcription. In order to determine whether p53 exerts a direct effect on *Xenopus laevis* DNA repair and replication, the p53 gene was cloned from a cDNA library of *Xenopus laevis* using PCR. The p53 gene and its deletion mutants were expressed in *Escherichia coli* (BL21(DH3) pLysS). Some of the *Xenopus* p53 deletion mutants and the human p53 antibody were used in a *Xenopus* DNA repair and replication assay system. Preliminary results suggest that p53 has an indirect effect on DNA repair and replication.

1. 研究目的

p 5 3 はガン抑制遺伝子であり, その転写調節作用によって細胞制御をもつと考えられていた。最近の研究から, 実はそれだけでなく, タンパク質間相互シグナル伝達, 酵素としての活性などの機能を持ち, これらが複合的に機能して細胞の命運を決定すると考えられている。p 5 3 は図 1 に示すようにN末端ドメイン(1~101番目のアミノ酸領域), コアドメイン(102~292番目のアミノ酸領域), C末端ドメイン(293~393のアミノ酸領域)の3つの領域からなる。

p 5 3 は, アフリカツメガエル以上の脊椎動物に存在し, I-Vで示した5つの領域は特にその構造がアフリカツメガエルからヒトまで種属を超えて高度に保存されている。最近, p 5 3 が転写因子としての機能とは独立してDNA修復系並びに複製系に直接関わっている可能性も示唆されている。一方, DNA修復並びに複製系も最近になって細胞周期や細胞自滅をはじめとする細胞内現象と互いに関連し, 重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。我々はDNA修復並びに複製系に関わるタンパク質の同定にアフリカツメガエルの卵母細胞を用いてきており, 最近, アフリ

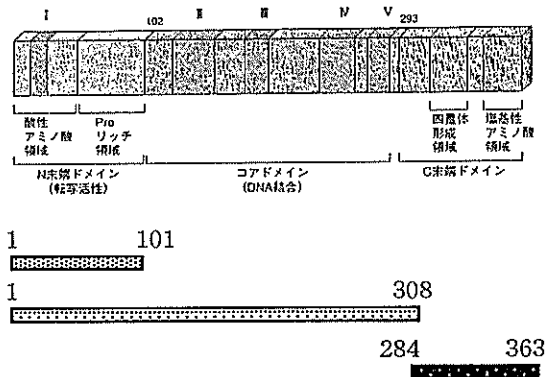


図 1. p53と欠失変異体の構造

- N末端ドメイン
- ▨ N末端+コアドメイン
- C末端ドメイン

カツメガエル卵母細胞からDNA修復及び複製効率が極めて高くかつバックグラウンドの低い核抽出液を調整することに成功した。この抽出液を用いたアッセイ系は直接目的とする蛋白質並びに抗体を用いて明確な解析ができる。本研究では, このアフリカツメガエル卵母細胞核抽出液をもちいたアッセイ系に p 5 3 蛋白質並びに変異体さらにそれらの抗体を導入することにより, p 5 3 とDNA修復系との関係を明らかにすることが最終的な目的である。

2. 研究経過

アフリカツメガエル卵母細胞DNA修復並びに複製の*in vitro*アッセイは、目的タンパク質が量的に多いことが望まれるため、アフリカツメガエル p 5 3 タンパク質を大腸菌にて大量発現することとした。アフリカツメガエル p 5 3 cDNAは、PCR法にてアフリカツメガエルcDNAライブラリーから調整した。目的とする全長1089bpのPCR産物を得ることができたので、それをpET15b大腸菌発現ベクターにサブクローニングした。p53全体の蛋白質の可溶性タンパク質の発現がもともと困難と予想されたこと、そしてp 5 3各ドメインのDNA修復並びに複製への影響をも明らかにするために、同時に図1に示すような3種の欠失変異型タンパク質、N末端ドメイン(1~101番目のアミノ酸領域)、C末端ドメインを欠くN+コアドメイン(1~308番目のアミノ酸領域)、C末端ドメイン(284~363のアミノ酸領域)を作成することとした。これら変異体は、full lengthのp 5 3 DNAを鋳型としてPCR法にて調整し、pET15b大腸菌発現ベクターに連結した。得られた構築体は、ABI Prism Big Dye Terminator Cycle sequencing kitを用いた蛍光法にて配列を確認した。大腸菌BL21DH3(pLysS)を用いて、full lengthのp 5 3及び欠失変異型タンパク質の発現を試みた。欠失変異体のうち、N末端ドメインとC末端ドメインの変異体タンパク質はニッケルカラムクロマトグラフィーにて精製でき、大量調整できた。それら変異体をもちいて、DNA複製(一本鎖から二本鎖DNA)に対する影響を調べた。また、市販のヒトp 5 3抗体を用いて紫外線損傷DNAに対する修復実験も予備的におこなった。

3. 研究成果

アフリカツメガエル p 5 3はクローニングし、大腸菌にて発現した。p 5 3の可溶

化体を大量調整することは困難であった。ヒトのp 5 3は既にクローニングされ、その市販抗体を得ることができたので、その抗体を用いて、DNA修復アッセイを行った(図2)。その結果、大きな影響は見られなかったが、僅かな阻害が観察された。用いた抗体について詳細に免疫学的解析を行う必要があるが、何らかの影響をもっている可能性を示した。アフリカツメガエルp 5 3の欠失変異体のうち、N末端ドメインとC末端ドメインの変異体タンパク質についてはクローニング及び大腸菌大量発現ができ、ニッケルカラムクロマトグラフィーにて精製することができた(図3)。これらのタンパク質を用いて、一本鎖から二本鎖DNAへの複製の影響を調べた。明確ではないが、これらタンパク質変異体を添加すると、DNA複製のシグナルが少し阻害された(図4)。DNA複製についても何らかの形で関わっている可能性が推測された。

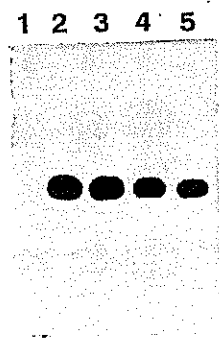


図2 ヒトp 5 3抗体の紫外線損傷DNA修復に対する影響。

レーン1: no UV DNA.

レーン2及び3: UV DNA(紫外線(25 J/m²)で損傷したDNA)のみ。

レーン4: UV DNA+ヒトp 5 3抗体10µg.

レーン5: UV DNA+ヒトp 5 3抗体20µg.

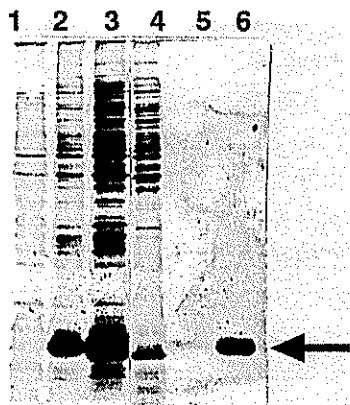


図3 p53C末端部大腸菌による発現
 レーン1 : IPTG誘導なし
 レーン2 : IPTG誘導4hr後
 レーン3 : IPTG誘導4hrフレンチプレス後
 レーン4 : ニッケルカラムflow through
 レーン5 : ニッケルカラムwash
 レーン6 : ニッケルカラムelute

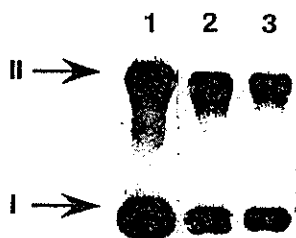


図4 アフリカツメガエルp53欠失変異体の一本鎖から二本鎖DNA複製へに対する影響
 一本鎖DNA(ssDNA)としてはM13mp18(+) DNAが用いられた。
 レーン1 : ssDNAのみ
 レーン2 : ssDNA + N末端発現タンパク質(100 μg)
 レーン3 : ssDNA + C末端発現タンパク質(100 μg)

3. 今後の課題と発展

解析に必要とされるタンパク質の大量発現はかなり困難であったため、予想以上に

時間を費やした。今後、それらに対する抗体を作成するなどして、DNA修復並びに複製について本格的に解析を行う。その結果に応じて、最終的にはいろいろな変異体を作成するなど詳細な解析を行っていく。

今後の発展については、p53 full length タンパク質の大量発現は、本研究とは別のタンパク質構造解析の立場からも大きな意味をもつと考えられる。これまでp53のfull lengthの可溶化物の大量発現は極めて困難であったため、全体の高次構造の研究は遅れているのが現状である。高次構造解析には多量のタンパク質を必要とする。我々は、大腸菌での大量発現の方法を改良したり、また酵母などの系を用いて可溶化タンパク質の大量発現系づくりに力を注いできた。full length p53の可溶化体を大量調製して、p53タンパク質の高次構造の研究へと発展させたい。

4. 本研究に関連する論文リスト及び学会活動実績

- 1) Oda, N., Saxena J. K., Jenkins, T. M., Prasad R., Wilson S. H., Ackerman E. J. (1996) DNA polymerases α and β are required for DNA repair in an efficient nuclear extract from *Xenopus* oocytes. *J. Biol Chem*, 271 13816—13820
- 2) Oda, N., Levin, J. D., Spoonde, A. Y., Frank E. G., Levine, A. S., Woodgate, R., Ackerman E. J. (1996) Arrested DNA replication in *Xenopus* and Release by *Escherichia. coli* mutagenesis proteins. *Science* 272, 1644-1646
- 3) 小田直子, 志牟田健, 堀川幸祐, 伊藤浩史, 鶴 大典「アフリカツメガエル p53 遺伝子の大腸菌による発現」(1998) 第240回 農芸化学西日本支部大会