

平成 29 年度

文部科学省 国家課題対応型研究開発推進事業
英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業

p53 ライフサイクルを利用して多様な生物で
の DNA 損傷応答を生きた状態で『見る』

成果報告書

平成 30 年 3 月
国立大学法人 東京工業大学

本報告書は、文部科学省の英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業による委託業務として、国立大学法人 東京工業大学が実施した平成 29 年度「p53 ライフサイクルを利用して多様な生物での DNA 損傷応答を生きた状態で『見る』」の成果を取りまとめたものです。

目次

概略	iii
1. はじめに	1
1.1 本事業の目的	1
1.2 背景-p53 のライフサイクル	1
1.3 本研究の革新性、独創性、新規性	2
1.4 平成 29 年度の目標	3
2. 業務計画	4
2.1 全体計画	4
2.2 平成 29 年度の成果の目標及び業務の実施方法	4
2.3 実施体制	5
3. 平成 29 年度の実施内容及び成果	6
3.1 DNA 損傷応答可視化システムを構成する遺伝子発現ベクターの構築	6
3.1.1 基本ベクター-pEGFP-C1-p53 の構築	6
3.1.2 pEGFP-C1-p53 の動作確認	8
3.1.3 マウス用ベクター-pCAG-GFP-p53 の構築	12
3.1.4 多様な真核生物種における p53-FP 発現ベクターの構築	14
(1)出芽酵母	14
(2)シロイヌナズナ	15
(3)ショウジョウバエ	16
(4)ゼブラフィッシュ	17
3.2 マウス、ヒトの組織・臓器モデルにおける DNA 損傷応答の可視化に向けた検討	18
3.2.1 マウスの組織・臓器モデルにおける可視化に向けた検討	18
3.2.2 マウスの組織・臓器モデルにおける可視化に向けた検討	20
3.3 多様な生物種における DNA 損傷応答の可視化の可能性の予備的検討	22
3.3.1 各生物種における p53、ATM、ATR に関する情報	22
3.3.2 各生物種において p53-FP の発現のためのプロモーター、ベクターの選定	22
3.3.3 出芽酵母における p53-FP の発現の検討	23
3.3.3 線虫における p53 の放射線応答に関する検討	23
3.3 研究推進	24
4. 結言	25
5. 参考文献	26
参考資料：用語の説明	27

図一覧

図 1-1	がん抑制タンパク質 p53 のライフサイクルについてのモデル	1
図 2-1	本業務の平成 29 年度の実施計画	4
図 2-2	本業務の実施体制	5
図 3-1	基本ベクター-pEGFP-C1-p53 の構造の模式図	7
図 3-2	pEGFP-C1-p53 ベクターおよび pEGFP-C1 ベクターを導入した ヒト培養細胞の蛍光顕微鏡像	9
図 3-3	ウェスタン・ブロッティング法による p53-FP (GFP-p53) の発現解析	9
図 3-4	pEGFP-C1-p53 を導入した U2OS 細胞の放射線照射後の蛍光顕微鏡像	10
図 3-5	pEGFP-C1-p53 を導入した U2OS 細胞で放射線照射後に 緑色蛍光を示した細胞の割合	10
図 3-6	pEGFP-C1-p53 を導入した U2OS 細胞、U2OS p53 欠損 (KO) 細胞、 H1299 細胞で放射線照射後に緑色蛍光を示した細胞の割合	11
図 3-7	マウス ES 細胞用ベクター-pCAG-GFP-p53 の構造の模式図	13
図 3-8	出芽酵母用ベクター-EGFP-TP53-Yplac211 の構造の模式図	14
図 3-9	シロイヌナズナ用ベクター-pRI21-AN+EGFP-p53 の構造の模式図	15
図 3-10	ショウジョウバエ用ベクター-pUASattBw+EGFP-p53 の構造の模式図	16
図 3-11	ゼブラフィッシュ用ベクター-pT20lactb+EGFP-p53 の構造の模式図	17
図 3-12	pCAG-EGFP-p53 ベクターを導入したマウス ES 細胞の蛍光顕微鏡像	19
図 3-13	ヒト iPS 細胞クローン NB1RGB C2 に pEGFP-C1-p53 を導入後 24 時間の蛍光顕微鏡像	21
図 3-14	ヒト iPS 細胞クローン NB1RGB C2 に pEGFP-C1-p53 を導入後 48 および 72 時間の蛍光顕微鏡像	21

略語一覧

ATM: Ataxia-telangiectasia Mutated

(毛細血管拡張性運動失調症変異(遺伝子またはタンパク質))

ATR: ATM and Rad3-Related (ATM および Rad3 関連(遺伝子またはタンパク質))

cDNA: complementary DNA (相補的 DNA)

ES: embryonic stem (胚性幹(細胞))

Hdm2: Human homologue of murine double minute

(マウス二重微小染色体(遺伝子またはタンパク質)ヒトホモログ)

iPS: induced pluripotent stem (人工多能性幹(細胞))

p53-FP: p53-fluorescent protein (p53-蛍光タンパク質)

PCR: polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

概略

本研究では、ヒトがん抑制遺伝子で、細胞周期チェックポイント、アポトーシスなどの DNA 損傷応答を司る p53 の制御の分子機構を利用し、動物はもとより植物、単細胞生物を含む真核生物全般にわたって適用可能で、かつ生きたままで見ることができる DNA 損傷応答可視化システムを提案する。具体的には、p53 と蛍光タンパク質との融合タンパク質、p53 を分解へと導く Hdm2 を同時発現し、通常の状態では蛍光強度が低く、放射線照射などによる DNA 損傷に応答して蛍光強度が増大するようなシステムを構築する。このシステムを持つトランスジェニックマウスを作製するとともに、ヒト、マウスの iPS 細胞あるいは ES 細胞から分化誘導によって試験管内でさまざまな組織、臓器を作り、組織、臓器が実際に機能している状態で DNA 損傷応答解析を行う。また、脊椎動物(ゼブラフィッシュ)、無脊椎動物(ショウジョウバエ、線虫)、植物(シロイヌナズナ)、単細胞生物(酵母)など広範な真核生物種にこのシステムを導入し、これらの生物が生きた状態での DNA 損傷応答解析を行う。

本年度はこのようなシステムの実現可能性を確かめるために、まず、ヒト、マウス細胞で放射線などの DNA 損傷によって蛍光強度が変化するような p53-蛍光タンパク質(p53-FP)発現ベクターを構築し、細胞が生きたまま DNA 損傷応答解析を行う実験系を確立すること、また、脊椎動物(ゼブラフィッシュ)、無脊椎動物(ショウジョウバエ、線虫)、植物(シロイヌナズナ)、単細胞生物(酵母)をモデルとして、p53-FP の発現や DNA 損傷に応答した蛍光強度変化が見られるか検討することを目的とし、業務を実施した。

まず、pEGFP-C1 ベクターに正常型・全長のヒト p53 遺伝子を挿入し、p53-FP ベクター(pEGFP-C1-p53)を作製した。これをヒト培養細胞 HCT116、U2OS、H1299 細胞に導入し、放射線照射を行い、放射線照射後に蛍光強度が増加することを確認した。次に、このベクターを元に、マウスに対して最も適切と考えられた CAG エンハンサーと CMV プロモーターに p53-FP を接続したベクター(pCAG-EGFP-p53)を作製した。また、出芽酵母、シロイヌナズナ、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュにおいて、p53-FP の発現に適切と考えられるプロモーターを含むベクターに p53-FP を接続したベクターの構築を実施した。

次に、マウス ES 細胞に pCAG-EGFP-p53 ベクターを導入した。また、ヒト正常線維芽細胞から樹立された iPS 細胞に pEGFP-C1-p53 ベクターを導入し、それぞれ、放射線照射を行い、蛍光強度の変化が顕著なクローンを選別した。

さらに、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、線虫、シロイヌナズナ、出芽酵母において p53-FP を用いた DNA 損傷応答の可視化の可能性について検討した。まず、それぞれの生物において p53、ATM、ATR に相当する分子に関して現在までに知られていることを整理し、放射線照射後の p53-FP の蛍光強度増加が見られるために必要な条件等について検討した。これを踏まえて、それぞれの生物種において p53-FP の発現に適切と考えられるプロモーターを含むベクターを選定した。

以上、1 カ年計画の 1 年目である本年度の業務項目を実施し、所期の目標を達成した。

1. はじめに

1.1 本事業の目的

医療分野以外にも生物体へ放射線照射利用・応用が拡大していることや、東電福島第一原発事故により環境中に放出された放射性物質の生態系全般への影響が不安視されていることなどに鑑み、一定の知見が蓄積されてきたヒトだけでなく、多様な生物種に対する放射線被ばくの影響解明、特に分子生物学的アプローチによる放射線被ばく影響、または傷害からの回復メカニズムの解明が求められている。

本事業では、ヒトがん抑制タンパク質で、細胞周期チェックポイント、アポトーシスなどのDNA 損傷応答を司る p53 の制御の分子機構を利用し、動物はもとより植物、単細胞生物を含む真核生物全般にわたって適用可能で、かつ生きた状態で「見る」ことができる DNA 損傷応答解析システムを提案し、ヒト、マウスのさまざまな組織・臓器モデルやさまざまな生物種に適用することを目標として行った。

1.2 背景-p53 のライフサイクル

p53 はヒトのさまざまな種類のがんの半数以上で変異、失活を起こしており、最も重要ながん抑制タンパク質と考えられている。p53 は DNA 上の特定の配列 (p53CON) に結合する転写因子であり、細胞周期チェックポイントに関わる p21、14-3-3 σ や、アポトーシスに関わる Bax、PUMA などの転写を促進することによって、がんを抑制していると考えられている。

図 1-1 は p53 のライフサイクルを示したものである。p53 による発現促進を受ける分子の一つに Hdm2 がある。Hdm2 は RING ドメインを持つタンパク質ユビキチン化酵素 (E3) であり、E1、E2 と協働して p53 をユビキチン化する。ユビキチン化された p53 はタンパク質分解工場であるプロテアソームに送られて分解される (*Inferno*)。つまり、p53 と Hdm2 はネガティブフィードバックループを形成し、p53 の発現は通常では低く抑えられている (*Purgatorio*)。

放射線照射などで細胞の DNA に損傷が生じると、ATM、ATR が p53 をリン酸化する。ATM、ATR はそれぞれ DNA 二重鎖切断、一本鎖 DNA (不対合 DNA) のセンサーと考えられるタ

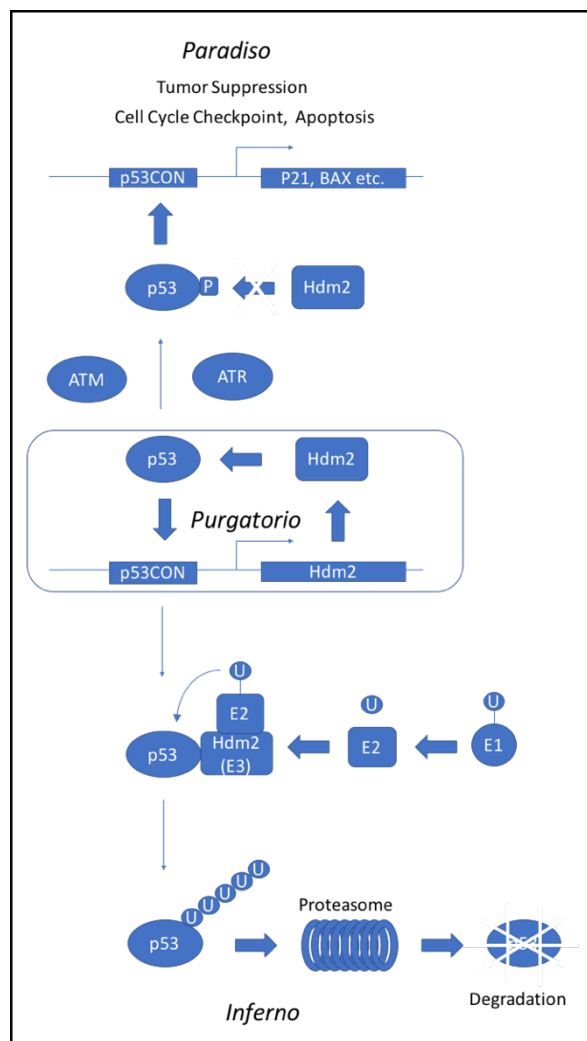


図 1-1 がん抑制タンパク質 p53 のライフサイクルについてのモデル

ンパク質リン酸化酵素である。p53 のリン酸化部位の一つである Ser15 は Hdm2 との結合部位に近く、リン酸化を受けると Hdm2 との結合が減弱する (*Paradiso*)。そのため、p53 がユビキチン化、分解を受けにくくなり、存在量が増える。これにより、p21 や Bax の発現誘導が起こることが、放射線照射後に見られる細胞周期チェックポイントやアポトーシスの機構であると考えられている。

1.3 本研究の革新性、独創性、新規性

このように、p53 は DNA 損傷に応答して、その存在量が劇的に増加する。p53 と蛍光タンパク質との融合タンパク質 (p53-FP) を作製すれば、p53 と同様の分解制御を受け、DNA 損傷に応答して蛍光強度が増加すると考えられる。本研究は、これにより細胞や生物個体が生きたまま DNA 損傷を可視化するシステムの構築を目指す。このシステムには、既存技術と比較して、下記のような革新性、独創性、新規性があると考えられる。

まず、「多様な生物で」DNA 損傷応答を可視化することが可能である。上記の通り、Hdm2 は p53 をユビキチン化、プロテアソームによる分解の世界 (*Inferno*) に導く分子である。ユビキチン化には、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン転移酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の 3 段階の酵素が関与し、Hdm2 は p53 に対する E3 である。E3 は一般的に基質分子 (ユビキチン化される分子) と E2 の両者に結合して、反応を促進する働きがある。E3 はそれぞれの基質分子に対して極めて多数存在するが、E2 は数種類から数十種類の E3 について共通であり、E1 は 1 種類である。したがって、生物種が離れても Hdm2 と共役する E2 が存在する可能性は高く、E1 に関してはほぼ確実である。また、p53 を細胞周期チェックポイント、アポトーシスの世界 (*Paradiso*) に導く ATM、ATR は、DNA 二重鎖切断、一本鎖 DNA (不対合 DNA) のセンサーとして DNA の代謝や安定性維持に本質的で普遍的な役割を担っている。それゆえに、そのホモログはこれまで調べられたほとんどの真核生物に存在する。したがって、ヒトの p53 と Hdm2 のみを導入することにより、ユビキチン-プロテアソーム系と ATM、ATR のホモログを有する全ての生物、細胞、すなわち、酵母からヒトに至るまでの多くの真核生物に置いて p53 のライフサイクルを再現できると考えられる。

次に、「生きたまま」DNA 損傷応答を可視化することが可能である。幅広い真核生物種に適用可能な DNA 損傷応答可視化技術として、ヒストン H2A のリン酸化を指標としたものがある。上述の ATM および同じファミリーに属する DNA-PKcs は DNA 二重鎖切断部位の周辺数 Mb にわたって、ヒストン H2A の C 末端部分に位置するセリンをリン酸化する (ヒトなどの場合は H2AX の Ser139)。このリン酸化は酵母からヒトに至るまで幅広い生物種で見られる。このリン酸化状態を特異的に認識する抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察するとドット状の像 (フォーカスという) が観察され、フォーカス 1 個が DNA 二重鎖切断 1 個に対応していると考えられている。この技術は広く用いられているが、染色操作が必要であることに加え、固定が必要であるため細胞や動植物個体が生きたまま観察することはできない。今回提案する技術は、細胞や動植物個体が生きた状態での観察を可能とするものである。また、抗体染色の場合、抗体が観察領域に一様に分布する必要があることから、厚みのある三次元観察には制限があり、切片を作製するなどの必要がある。一方で、本研究で提案する技術は光さえ通れば厚みのある対象でも切片を作製することなく観察することが可能であり、組織の三次元解析に適していると考えられる。

1.4 平成 29 年度の目標

本年度はこのようなシステムの実現可能性を確かめるために、まず、ヒト、マウス細胞で放射線などの DNA 損傷によって蛍光強度が変化するような p53-蛍光タンパク質 (p53-FP) 発現ベクターを構築し、細胞が生きたままで DNA 損傷応答解析を行う実験系を確立すること、また、脊椎動物 (ゼブラフィッシュ)、無脊椎動物 (ショウジョウバエ、線虫)、植物 (シロイヌナズナ)、単細胞生物 (出芽酵母) をモデルとして、p53-FP の発現や DNA 損傷に応答した蛍光強度変化が見られるか検討することを目的とし、業務を実施した。

2. 業務計画

2.1 全体計画

本業務の全体計画図を図 2-1 に示す。

区分	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
(1) DNA 損傷応答可視化システムを構成する遺伝子発現ベクターの構築							←					→
(2) マウス、ヒトの組織・臓器モデルにおける DNA 損傷応答の可視化の検討												
① マウスの組織・臓器モデルにおける検討							←					→
② ヒトの組織・臓器モデルにおける検討							←					→
(3) ③多様な生物種における DNA 損傷応答の可視化の可能性の予備的検討							←					→
(4) 研究推進							▲				▲	

図 2-1 本業務の平成 29 年度の実施計画

2.2 平成 29 年度の成果の目標及び業務の実施方法

平成 29 年度の計画の概要は、1.4 でも述べたようにまず、ヒト、マウス細胞で放射線などの DNA 損傷によって蛍光強度が変化するような p53-蛍光タンパク質融合タンパク質 (p53-FP) 発現ベクターを構築し、細胞が生きたままで DNA 損傷応答解析を行う実験系を確立する。また、脊椎動物(ゼブラフィッシュ)、無脊椎動物(ショウジョウバエ、線虫)、植物(シロイヌナズナ)、単細胞生物(酵母)をモデルとして、p53-FP の発現や DNA 損傷に応答した蛍光強度変化が見られるか検討することとした。

具体的な計画は、以下の通り策定した。

(1) DNA 損傷応答可視化システムを構成する遺伝子発現ベクターの構築

蛍光タンパク質発現ベクター (pEGFP-N1、pEGFP-C1 など) に正常型・全長のヒト p53 遺伝子あるいは部分断片を挿入し、p53-FP 発現ベクターを作製する。また、さまざまな生物種に対応して適切なプロモーターに p53-FP を接続したベクターを作製する。

(2) マウス、ヒトの組織・臓器モデルにおける DNA 損傷応答の可視化に向けた検討

① マウスの組織・臓器モデルにおける可視化に向けた検討

今後のマウス組織・臓器モデルシステム構築とトランスジェニックマウス作製に向けて、マウス胚性幹 (embryonic stem; ES) 細胞に①で作製したベクターを導入する。クローンを単離して、放射線照射を行い、蛍光強度の変化が顕著なクローンを選別する。

② ヒトの組織・臓器モデルにおける可視化に向けた検討

今後のヒト組織・臓器モデルシステム構築に向けて、ヒト人工多能性幹 (induced

pluripotent stem; iPS)細胞に①で作製したベクターを導入する。クローンを単離して、放射線照射を行い、蛍光強度の変化が顕著なクローンを選別する。

(3) 多様な生物種における DNA 損傷応答の可視化の可能性の予備的検討

今後の実用化を視野に、他の生物種における DNA 損傷応答の可視化の可能性について予備的検討を行う。

(4) 研究推進

研究代表者の下で各研究項目間の連携を密にして、研究を進める。また、研究実施計画等を協議するための委員会を開催する。

2.3 実施体制

本業務の実施体制を図 2-3 に示す。(協)は協力者を示す。

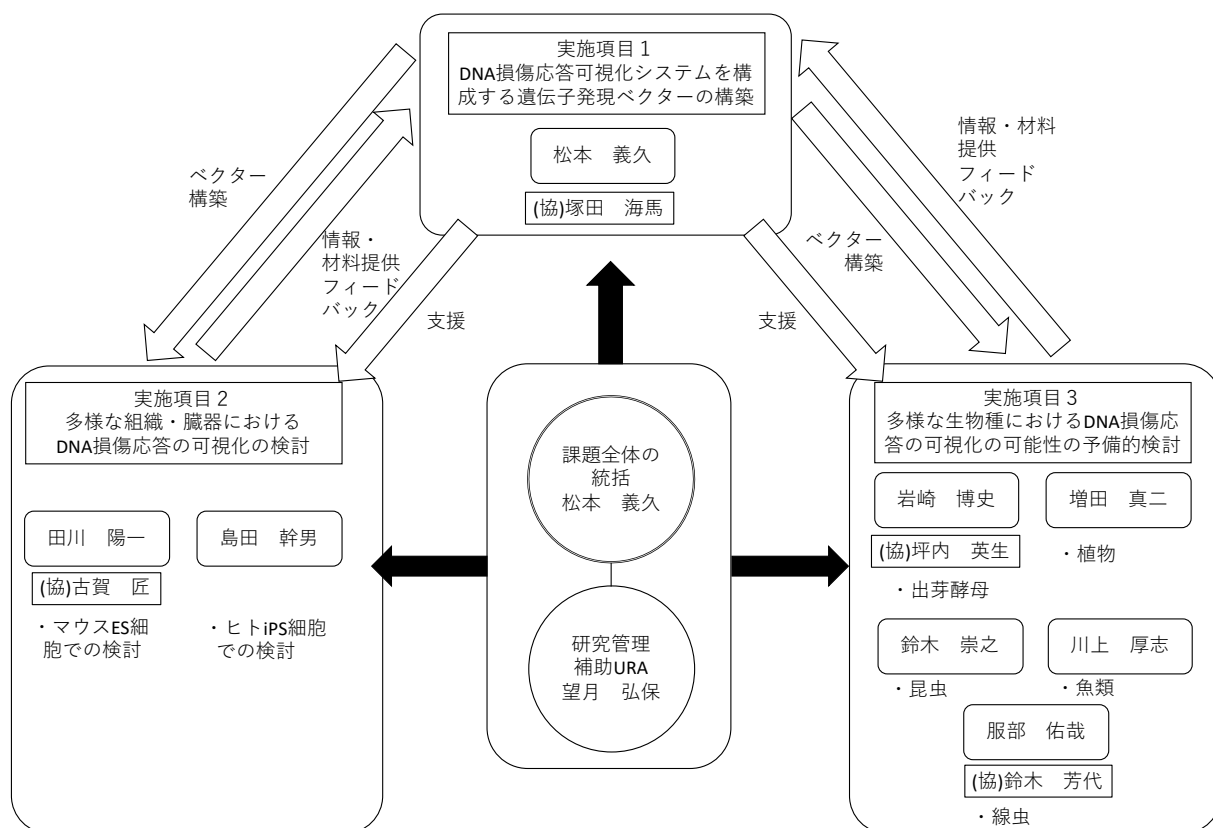


図 2-2 本業務の実施体制

3. 平成 29 年度の実施内容及び成果

3.1 DNA 損傷応答可視化システムを構成する遺伝子発現ベクターの構築

まず、pEGFP-C1 ベクターに正常型・全長のヒト p53 遺伝子を挿入し、p53-FP ベクター (pEGFP-C1-p53) を作製した。これをヒト培養細胞 HCT116、U2OS、H1299 細胞に導入し、放射線照射を行い、放射線照射後に蛍光強度が増加することを確認した。次に、このベクターを元に、マウスに対して最も適切と考えられた CAG エンハンサーと CMV プロモーターに p53-FP を接続したベクター (pCAG-EGFP-p53) を作製した。また、出芽酵母、シロイヌナズナ、シヨウジョウバエ、ゼブラフィッシュにおいて、p53-FP の発現に適切と考えられるプロモーターを含むベクターに p53-FP を接続したベクターの構築を実施した。

3.1.1 基本ベクターpEGFP-C1-p53 の構築

最初に、基本となる p53-蛍光タンパク質 (p53-FP) 発現ベクターの作製を行った。p53-FP の設計として、[1] 蛍光タンパク質として何を用いるか (蛍光色として緑色、赤色、黄色、橙色、青色など、また、緑色の中でも色彩や蛍光強度が異なる GFP、EGFP、AcGFP などがある)、[2] 蛍光タンパク質のアミノ末端 (N 末端)、カルボキシル末端 (C 末端) のどちらに p53 を接続するか、[3] p53 の全長を接続するか、一部分を接続するか、また、一部分であればどの部分か、などさまざまなものが考えられた。いずれを選択するかによって、p53-FP の発現や放射線照射に対する応答に違いを生じうる。また、プロモーターやエンハンサーの選択も重要である。まず、松本らの従来の研究 (1, 2) で用いられた pEGFP-C1 ベクターの multiple cloning site (MCS) にヒト p53 の全長の cDNA を挿入することとした。

pEGFP-C1 ベクターは Clontech 社から購入したものである。また、ヒト p53 の全長の cDNA は、松本らの従来の研究 (3) で用いられたもので、同じく Clontech 社から購入した pCMV-p53 ベクターに組み込まれているものを用いた。pEGFP-C1 を制限酵素 *Sa*II を用いて切断した。一方、ヒト p53 全長 cDNA を得るために、pCMV-p53 を制限酵素 *Sa*II と *Xho*I を用いて切断し、電気泳動で分離後、約 1.2kb の断片を切り出した。これらを混合して、T4 DNA ligase IV 存在下で反応させ、連結した後、大腸菌に導入した。抗生物質カナマイシン存在下で形成された大腸菌コロニーを数個ピックアップして更に増殖させ、そこからプラスミド DNA を精製し、サンガー法シーケンシングによる塩基配列確認を行った。その結果、pEGFP-C1 の MCS の *Sa*II 切断部位にヒト p53 の全長が挿入され、また、正常な配列が保持されているプラスミドが得られた。これを pEGFP-C1-p53 ベクターとし、次頁の図 3-1 にその構造を示す。

pEGFP-C1-p53 ベクターでは、GFP の C 末端に全長 393 アミノ酸からなる p53 タンパク質が繋がった融合タンパク質 (p53-FP) の mRNA がサイトメガロウイルス (CMV) の強力なエンハンサー、またはプロモーターによって発現されるようになっている。また、pEGFP-C1 ベクターにはもともと、ベクターがゲノムに組み込まれ、目的タンパク質 (この場合、p53-FP) を持続的に発現する細胞の選択を可能とするために、ネオマイシン耐性遺伝子が入っている。

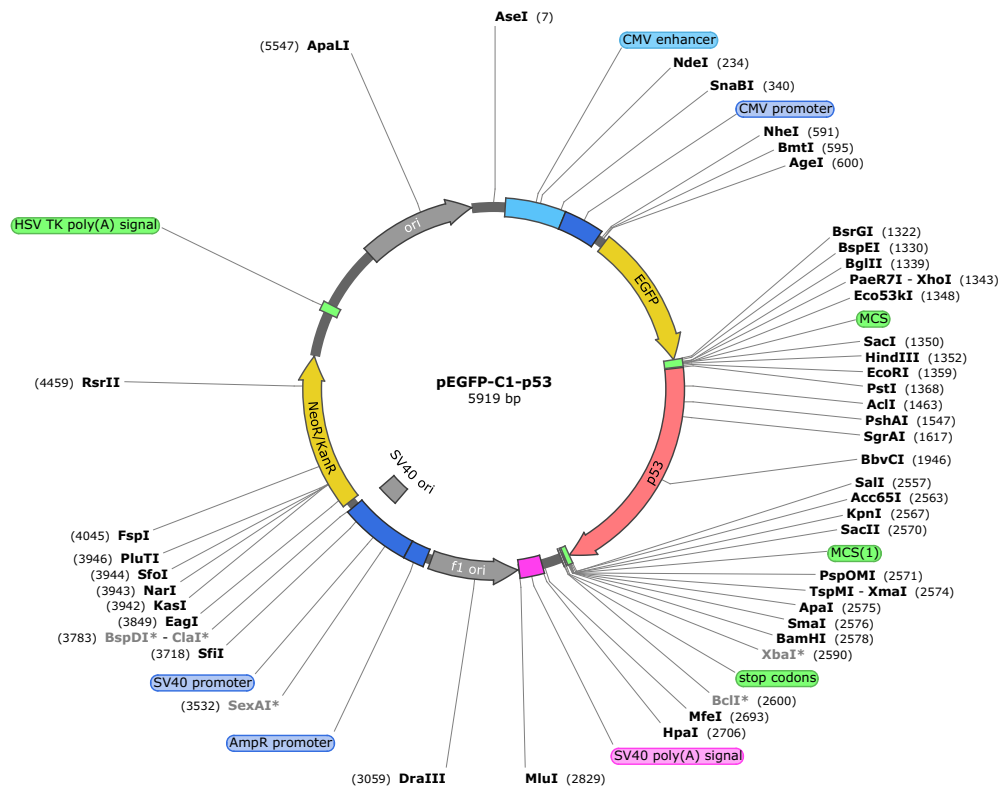


図 3-1 基本ベクターpEGFP-C1-p53 の構造の模式図

3. 1. 2 pEGFP-C1-p53 の動作確認

前節で作製した pEGFP-C1-p53 から p53-FP が発現されるか、放射線応答性を示すかについて、ヒト培養細胞を用いて検討した。用いた細胞は、ヒト大腸癌由来 HCT116 細胞、ヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞、ヒト肺癌細胞 H1299 細胞の 3 種類である。このうち、HCT116 細胞、U2OS 細胞は正常な p53 遺伝子を有していることが知られている。一方、H1299 細胞は p53 遺伝子を欠損し、内在性の p53 タンパク質の発現が完全に失われている。HCT116 細胞および U2OS 細胞については、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した p53 遺伝子欠損株も合わせて用いた。培養液は RPMI1640 培地もしくはダルベッコ改変型イーグル培地 (DMEM、4.5 g/L glucose) に 10% 容の牛新生胎仔血清 (NBCS)、1% 容のペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液を添加したものをを用いた。RPMI1640 培地、DMEM 培地はナカライテスク社から、また、NBCS は Hyclone 社から購入した。培養は 37°C、CO₂ 濃度 5% に設定したインキュベーター中で行った。継代の際には培養液を取り除き、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した後、0.25% Trypsin, 0.1 mM EDTA 溶液で処理して、細胞を培養容器から剥離した。

まず、pEGFP-C1-p53 ベクターを HCT116 細胞、U2OS 細胞、H1299 細胞に導入した。導入方法としては、Lipofectamine 2000 (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) を用いたリポフェクション法を用いた。また、合わせて、p53 が入っていない pEGFP-C1 ベクターを対照として用いた。図 3-2 に導入 1 日後に蛍光顕微鏡観察を行った結果を示す。pEGFP-C1 ベクターを導入した細胞では細胞全体で (多角形状に) 緑色蛍光が見られたのに対し、pEGFP-C1-p53 ベクターを導入した細胞では核で (楕円状に) 緑色蛍光が見られた。詳細にみると、緑色蛍光が見られない点状の部分が核 1 個あたり数個見られた。これは核小体であると考えられた。核小体を除く核全体に分布するのは、これまでに知られている p53 の細胞内局在と一致している。以上の結果から、pEGFP-C1-p53 ベクターから p53-FP タンパク質が発現し、内在性 p53 と同様、核に局在したと判断した。

また、ウェスタン・ブロッティング法においても、予想される分子量の位置に p53-FP のバンドが確認された (図 3-3)。なお、図 3-3 において、KO と記載したものは、HCT116 および U2OS から作製した p53 遺伝子欠損細胞である。

次に、蛍光強度が放射線照射によって増強するかどうか検討した。放射線照射は本学放射線総合センターコバルト照射施設にて行った。照射した放射線はコバルト 60 線源から放出される 662 keV の γ 線で、線量は 1 Gy、2 Gy、5Gy、線量率は 0.5-5 Gy/min とした。図 3-4 および図 3-5 に U2OS 細胞に放射線照射し、30 分後から 24 時間後まで経時的に蛍光顕微鏡観察を行った結果を示す。非照射時には緑色蛍光を示した細胞が 7% であったが、1-5 Gy 照射 30 分後に 85% 以上となった。緑色蛍光を示した細胞の割合は 2 時間後まで維持され、4 時間後から減少し、24 時間後には非照射時とほぼ同等の 8-9% となった。また、放射線量が増えるにつれ、減少が遅くなる傾向が認められた。U2OS 由来 p53 欠損細胞および H1299 細胞でも同様の傾向が認められた (図 3-6)。以上の結果から、pEGFP-C1-p53 ベクターから発現された p53-FP は、内在性 p53 と同様に、放射線照射に応答してその量が増加すること、それを蛍光顕微鏡で観察できることが確認できたと判断した。よって、これを基本ベクターとして、ヒト iPS 細胞に適用するとともに、他の生物用のベクターを作製することとした。

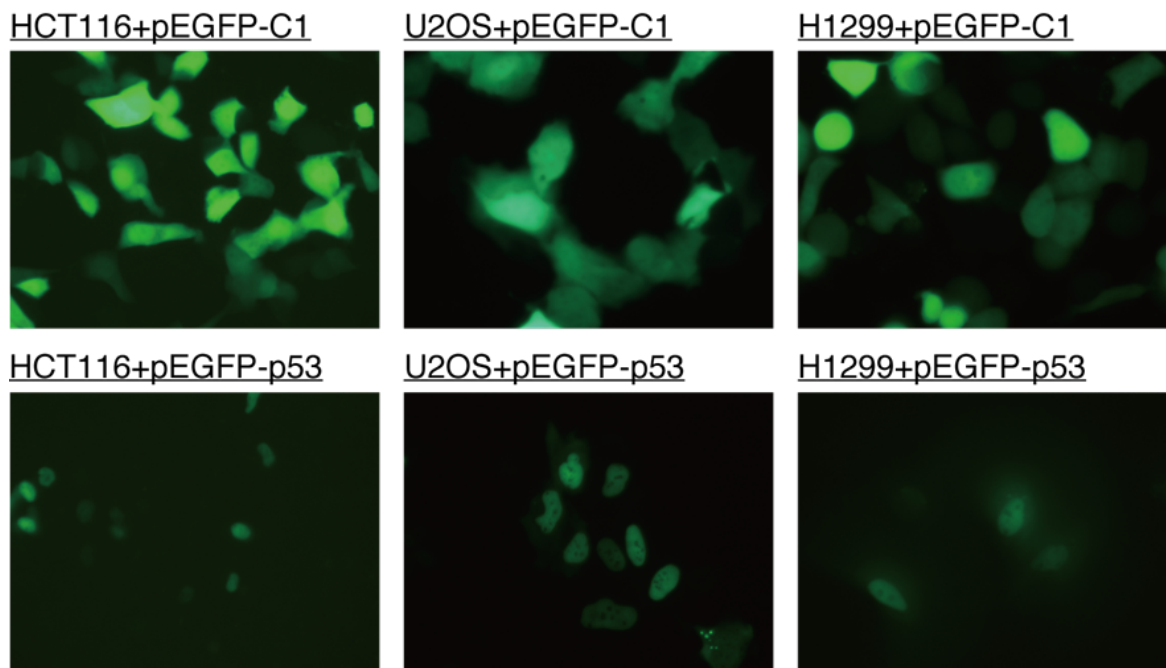


図 3-2 pEGFP-C1-p53 ベクターおよび pEGFP-C1 ベクターを導入したヒト培養細胞の蛍光顕微鏡像

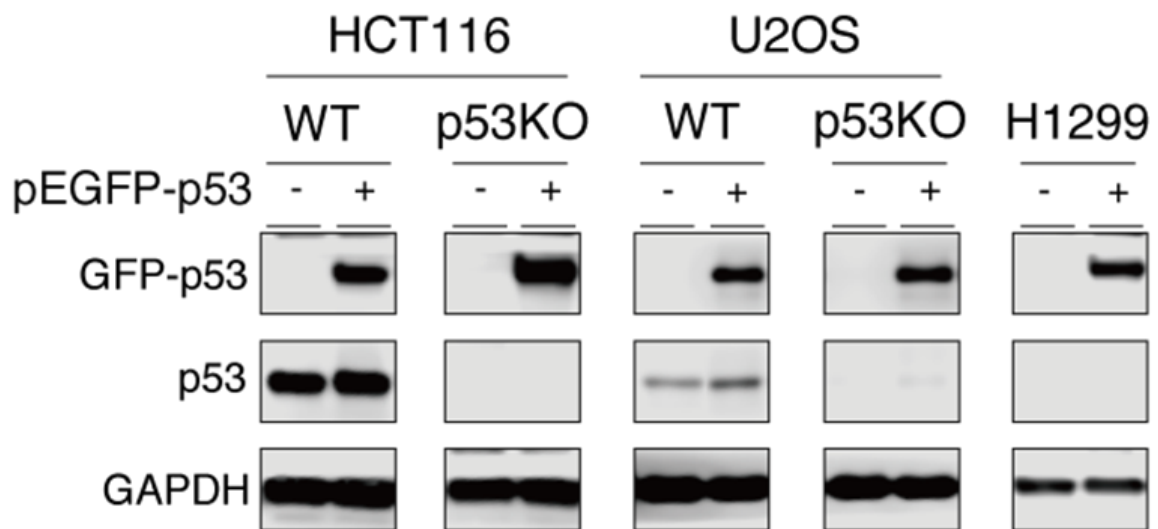


図 3-3 ウェスタン・ブロッティング法による p53-FP (GFP-p53) の発現解析

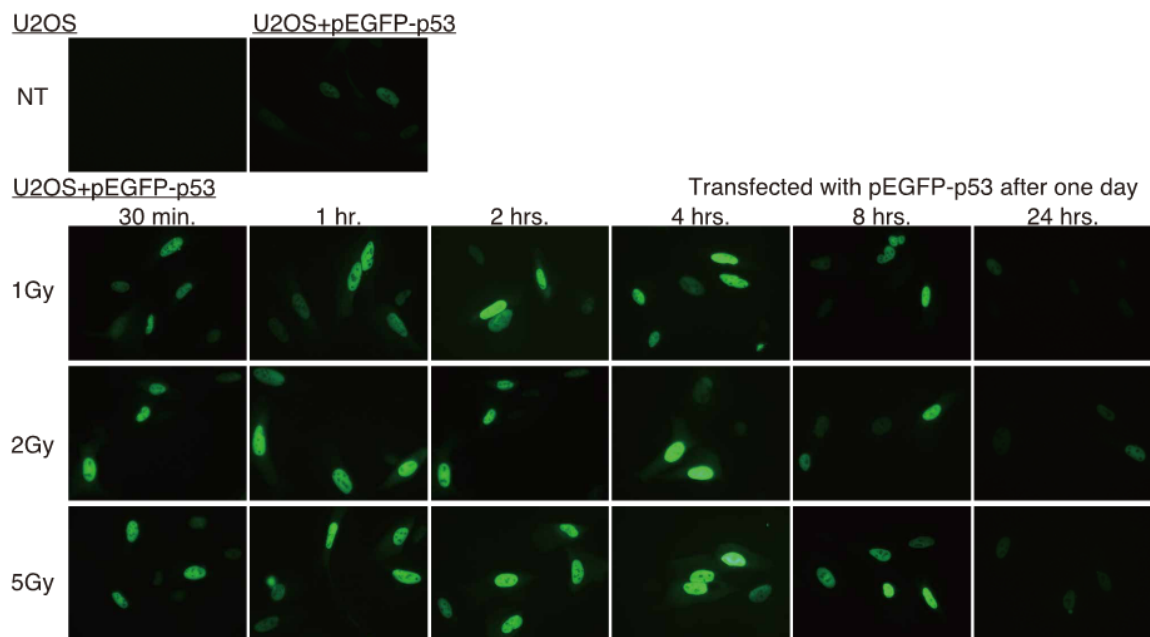


図 3-4 pEGFP-C1-p53 を導入した U2OS 細胞の放射線照射後の蛍光顕微鏡像

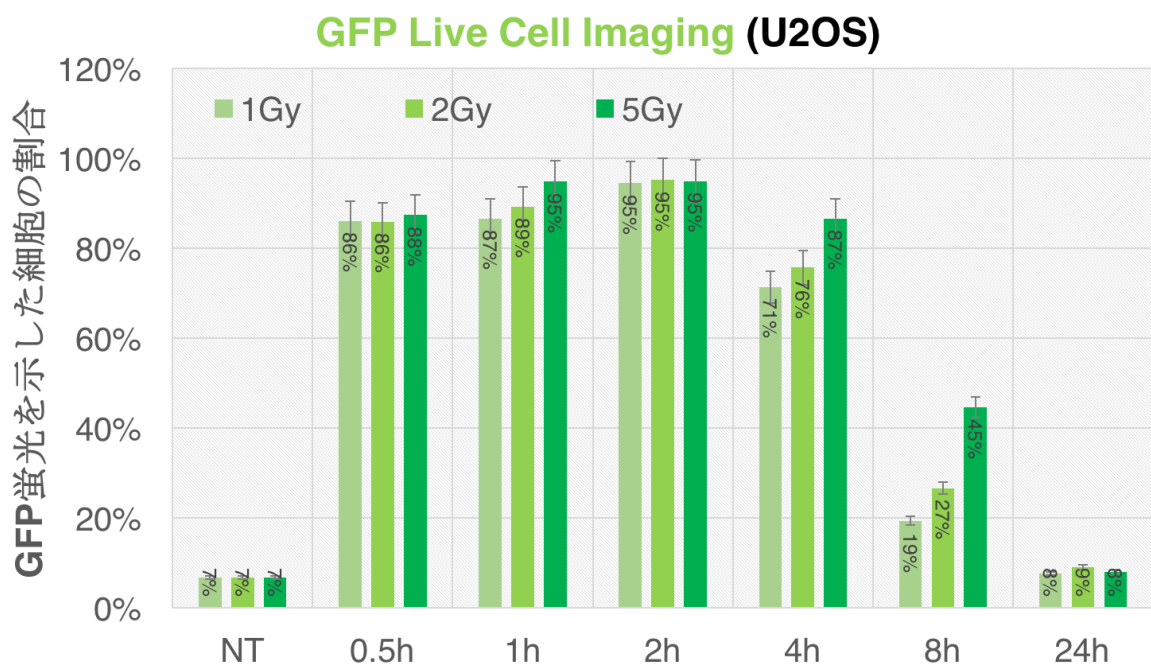


図 3-5 pEGFP-C1-p53 を導入した U2OS 細胞で放射線照射後に緑色蛍光を示した細胞の割合

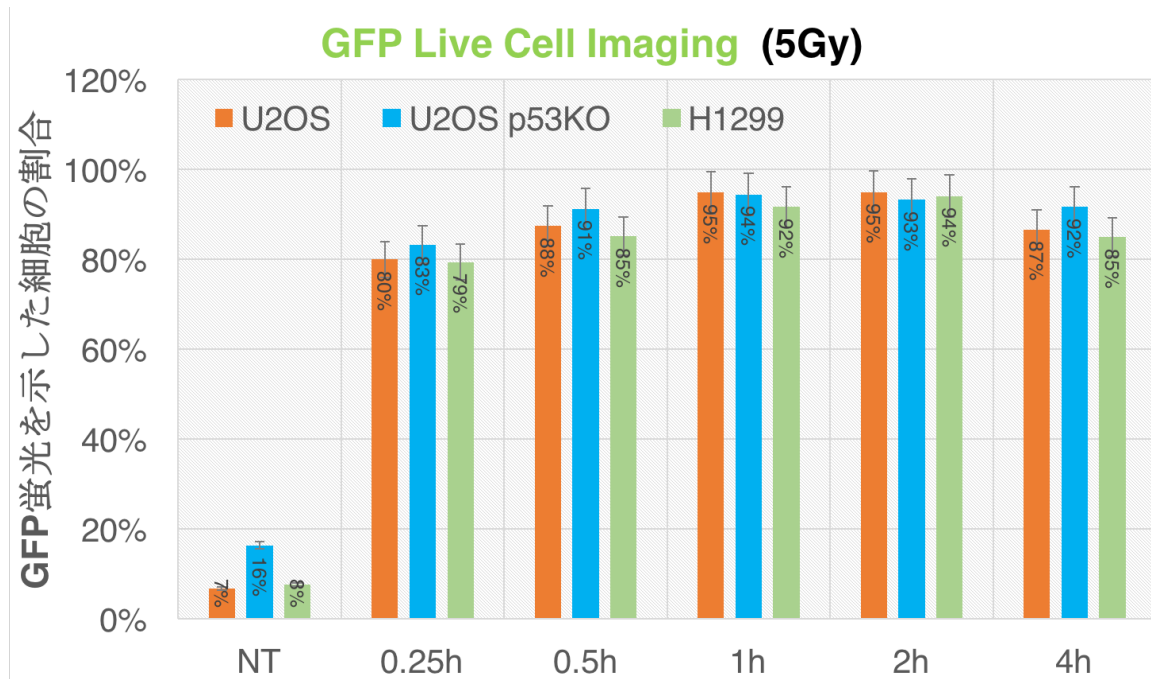


図 3-6 pEGFP-C1-p53 を導入した U2OS 細胞、U2OS p53 欠損 (KO) 細胞、H1299 細胞で放射線照射後に緑色蛍光を示した細胞の割合

3.1.3 マウス用ベクターpCAG-GFP-p53の構築

マウスでの p53-FP の発現ベクターについて、トランスジェニックマウス作製を視野に入れて検討した結果、田川らの以前の研究(4)で用いた実績がある pCAGGS ベクターが適切と考えられた。pCAGGS ベクターでは、CMV エンハンサーとトリ β アクチンのプロモーターによって目的遺伝子の発現が制御される構造となっている。

MCS の配列を検討した結果、pCAGGS ベクターの制限酵素 *XhoI* による切断部位に p53-FP cDNA を挿入するのが適切と考えられた。p53-FP cDNA を得るため、まず、pEGFP-C1-p53 の p53-FP cDNA 部分の両端に制限酵素 *SaI* による切断部位配列を付加して、ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)による増幅を行った。この増幅断片をアガロースゲル電気泳動で精製後、制限酵素 *SaI* で切断した。これと制限酵素 *XhoI* で切断した pCAGGS ベクターを混合して、T4 DNA ligase IV 存在下で反応させ、連結した後、大腸菌に導入した。抗生物質アンピシリン存在下で形成された大腸菌コロニーを数個ピックアップして更に増殖させ、そこからプラスミド DNA を精製し、p53-FP cDNA が含まれているものを選択した。

マウス細胞ゲノムに組み込む際、ベクターを制限酵素で1カ所切断し、直鎖状にした方が効率がよいと考えられた。この際、制限酵素 *PvuII* で切断することが望ましいと考えられたが、p53 遺伝子内に *PvuII* によって切断される配列があった。そこで、p53 遺伝子内の *PvuII* 切断部位にアミノ酸が変化しないような変異を導入し、*PvuII* による切断が起こらないようにすることとした。具体的には、PrimeSTAR Mutagenesis キット(タカラバイオ社)を用いた PCR 法によって変異を導入した。これを再度大腸菌に導入し、抗生物質アンピシリン存在下で形成されたコロニーを数個ピックアップして更に増殖させ、そこからプラスミド DNA を精製した。サンガー法シーケンシングによる塩基配列確認を行った結果、pCAGGS の目的部位に p53-FP cDNA が挿入され、*PvuII* 部位の変異を除いて正常ヒト p53 遺伝子と同一の配列をもつプラスミドが得られた。これを pCAG-GFP-p53 ベクターとし、次頁の図 3-7 にその構造を示す。

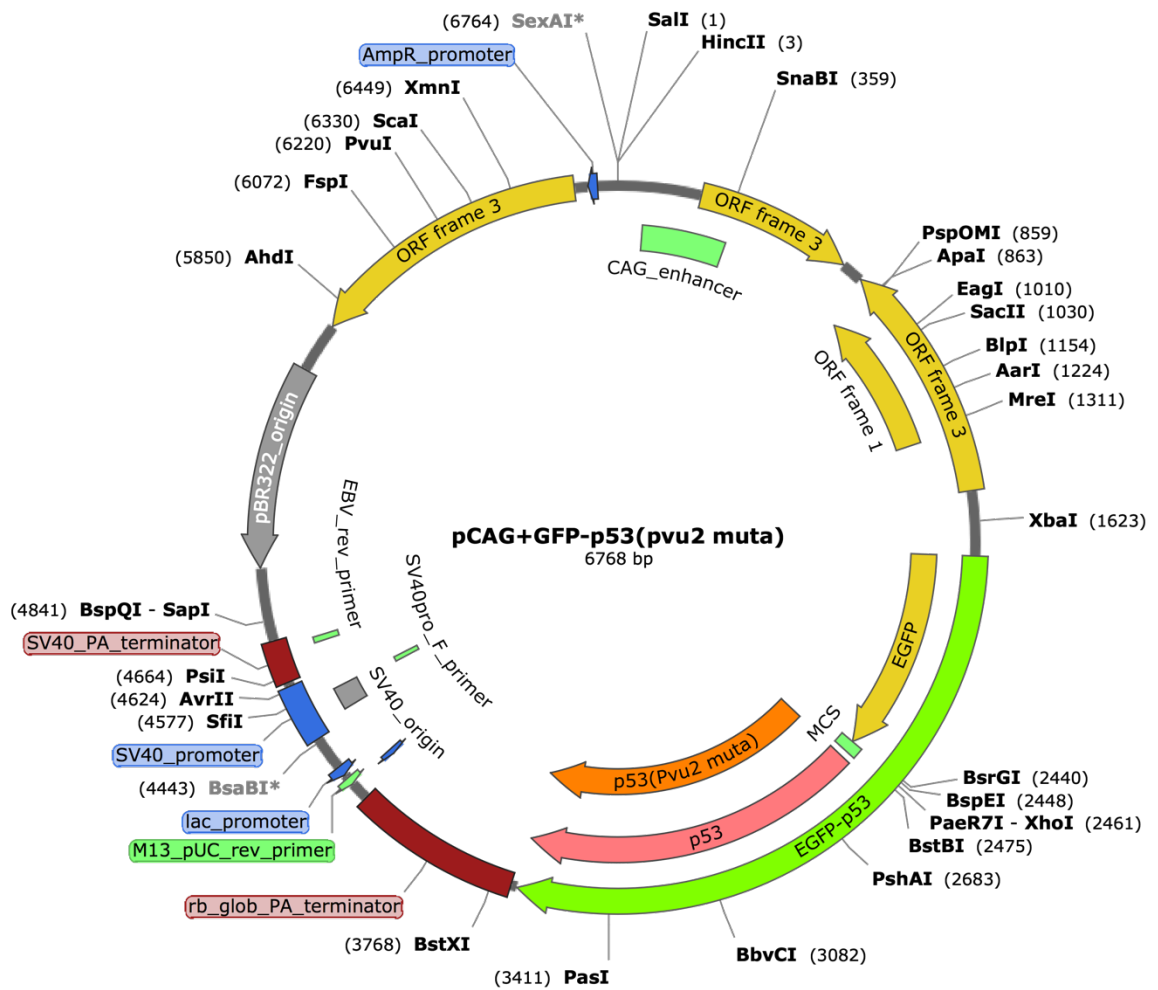


図 3-7 マウス ES 細胞用ベクターpCAG-GFP-p53 の構造の模式図

3.1.4 多様な真核生物種における p53-FP 発現ベクターの構築

3.3.2 での検討結果を踏まえ、出芽酵母、シロイヌナズナ、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュの各生物種において p53-FP の発現に適切と考えられるプロモーター、エンハンサーを用いて発現ベクターの構築を行った。

(1)出芽酵母

3.1.1 で作製した pEGFP-C1-p53 から EGFP および p53 部分を制限酵素によって切り出し、Yplac211 ベクターの ADH2 プロモーターと ADH2 ターミネーターの間に挿入した。次に、3.3.3 においてこの組換えベクターを出芽酵母に導入し、第 5 染色体の *URA3* 遺伝子座に挿入した。これを EGFP-TP53-Yplac211 ベクターとし、図 3-8 にその構造を示す。

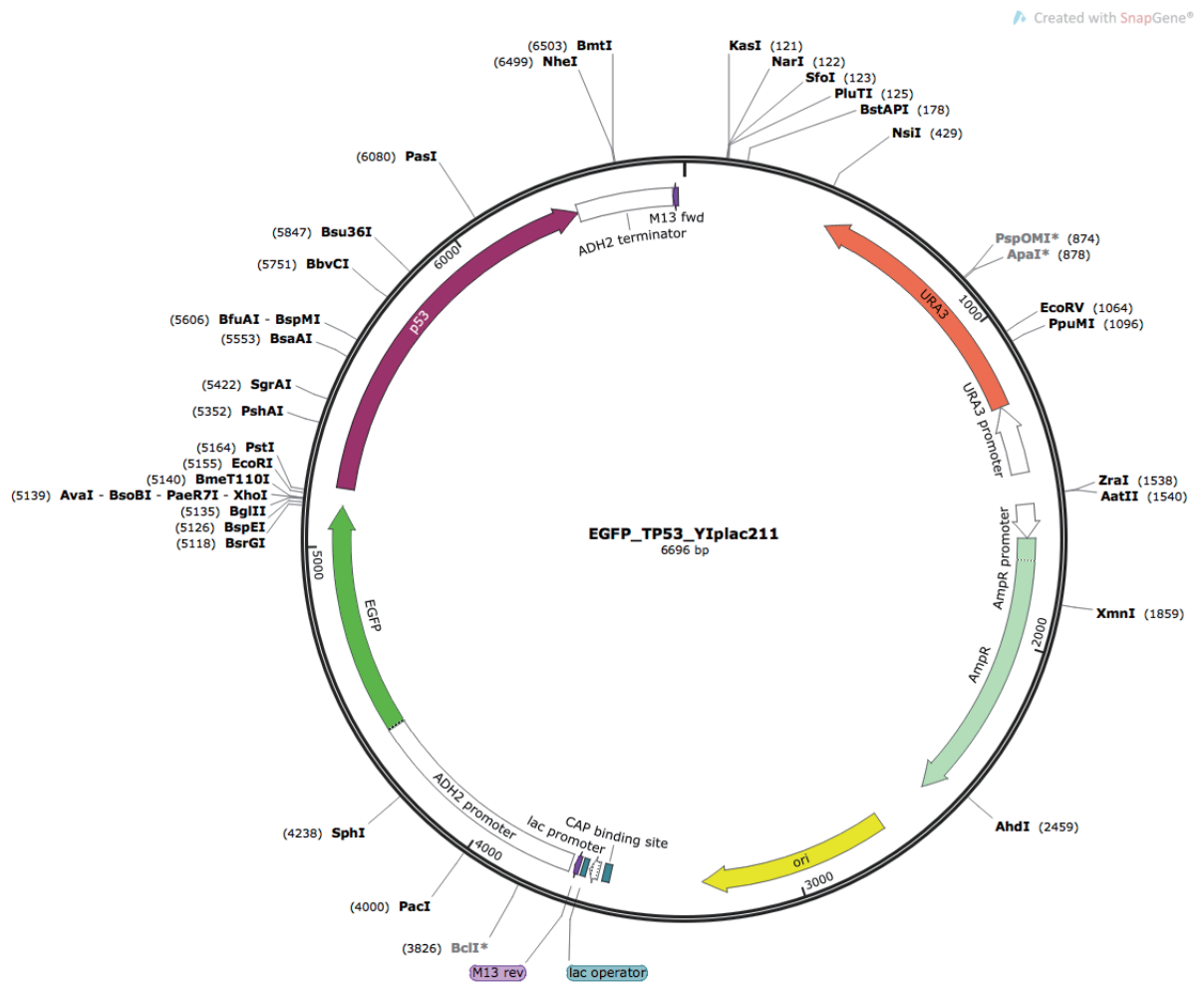
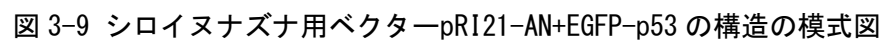


図 3-8 出芽酵母用ベクターEGFP-TP53-Yplac211 の構造の模式図

3.1.3 で作製した pCAG-GFP-p53 ベクターから EGFP および p53 部分を pRI201-AN ベクターの 1 つ目の MCS に挿入することとし、図 3-9 に示す pRI201-AN+EGFP-p53 ベクターを設計した。作製法としては、まず、制限酵素による切断と T4 ligase による連結による方法、InFusion キットを用いた組換え反応による方法を試みた。



(3) ショウジョウバエ

3.1.3 で作製した pCAG-GFP-p53 ベクターから EGFP および p53 部分を pUASattBw ベクターの MCS に挿入することとし、図 3-10 に示す pUASattBw+EGFP-p53 ベクターを設計した。作製法としては、まず、制限酵素による切断と T4 ligase による連結による方法、InFusion キットを用いた組換え反応による方法を試みた。

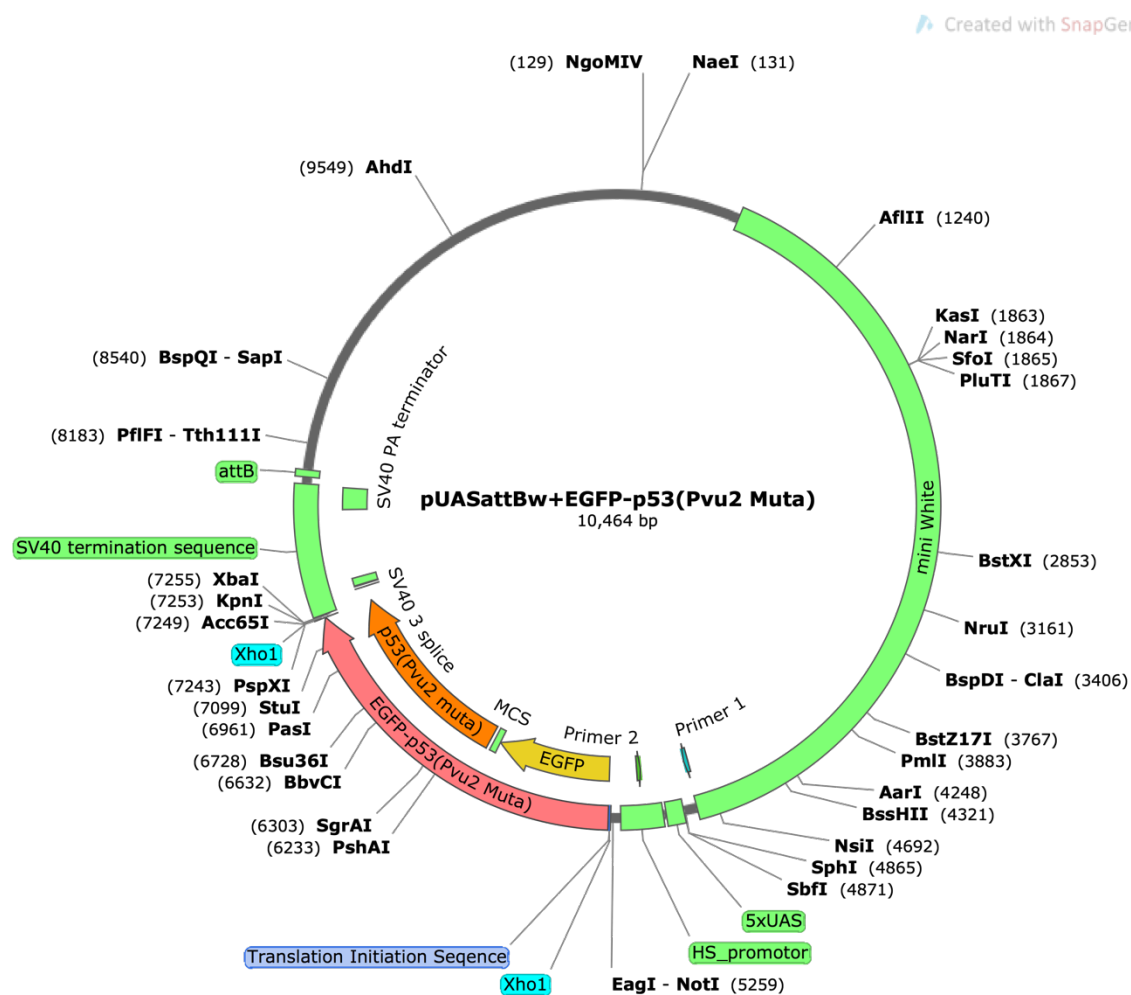


図 3-10 ショウジョウバエ用ベクター pUASattBw+EGFP-p53 の構造の模式図

(4)ゼブラフィッシュ

3.1.3 で作製した pCAG-GFP-p53 ベクターから EGFP および p53 部分を pT20lactbloxP-dsR2-loxP-EGFP ベクターの制限酵素 *Sa*I および *Sma*I による切断部位の間に挿入することとし、図 3-11 に示す pT20lactb+EGFP-p53 ベクターを設計した。作製法としては、まず、制限酵素による切断と T4 ligase による連結による方法、InFusion キットを用いた組換え反応による方法を試みた。

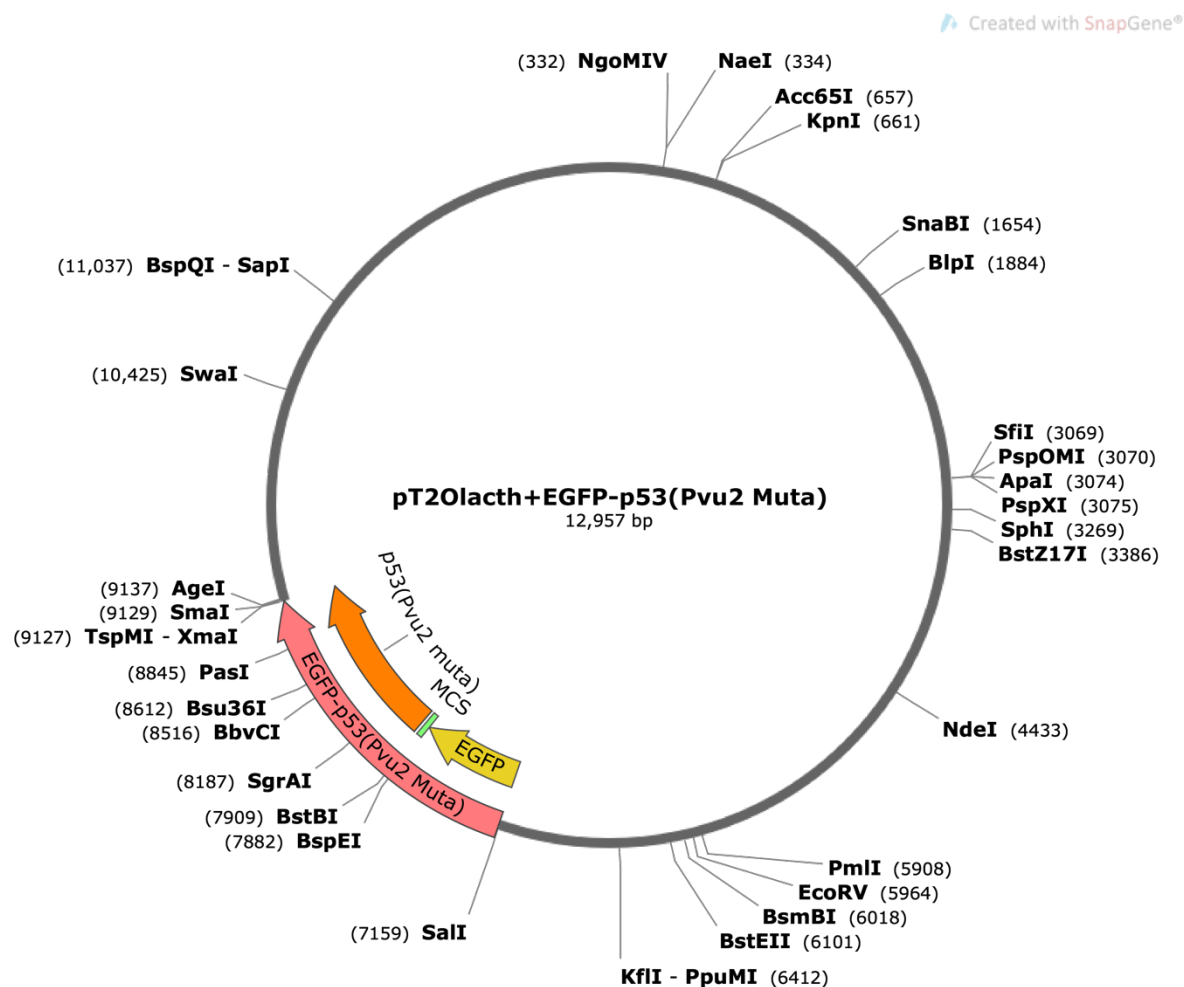


図 3-11 ゼブラフィッシュ用ベクターpT20lactb+EGFP-p53 の構造の模式図

3.2 マウス、ヒトの組織・臓器モデルにおける DNA 損傷応答の可視化に向けた検討

「マウスの組織・臓器モデルにおける可視化に向けた検討」では、マウス ES 細胞に pCAG-EGFP-p53 ベクターを導入した。次に、クローンを単離し、放射線照射を行い、蛍光強度の変化が顕著なクローンを選別した。

「ヒトの組織・臓器モデルにおける可視化に向けた検討」では、ヒト正常線維芽細胞から樹立された iPS 細胞に pEGFP-C1-p53 ベクターを導入した。次に、クローンを単離し、放射線照射を行い、蛍光強度の変化が顕著なクローンを選別した。

3.2.1 マウスの組織・臓器モデルにおける可視化に向けた検討

マウス ES 細胞の調製、培養は、田川らの以前の報告[5]に従って行った。培養液は、DMEM 培地に 20%容の牛胎児血清、1 mM のピルビン酸ナトリウム、100 μ M の非必須アミノ酸、100 μ M の 2-メルカプトエタノール、 10^3 U/ml の白血病阻害因子(LIF)を添加したものを用いた。培養は 37°C、5% CO₂ 存在下で行った。

ES 細胞に pCAG-EGFP-p53 ベクターを導入し、選択薬剤 G418 存在下で形成されたコロニーをピックアップし、24 穴プレートに移した。3.1.2 と同様に、本学コバルト照射施設にて、0.5 Gy/min の線量率で、1 Gy の γ 線を照射した。照射前後の緑色蛍光を蛍光顕微鏡と蛍光プレートリーダーで解析した。72 個のコロニーについて検討を行ったが、蛍光プレートリーダーで蛍光が検出されたものはなかった。また、蛍光顕微鏡観察においても、各穴で大きなコロニーでの蛍光は見られなかった。しかしながら、その周辺の小さなコロニー(サテライトコロニー)で蛍光が見られたものが 2 クローン得られた(図 3-2)。

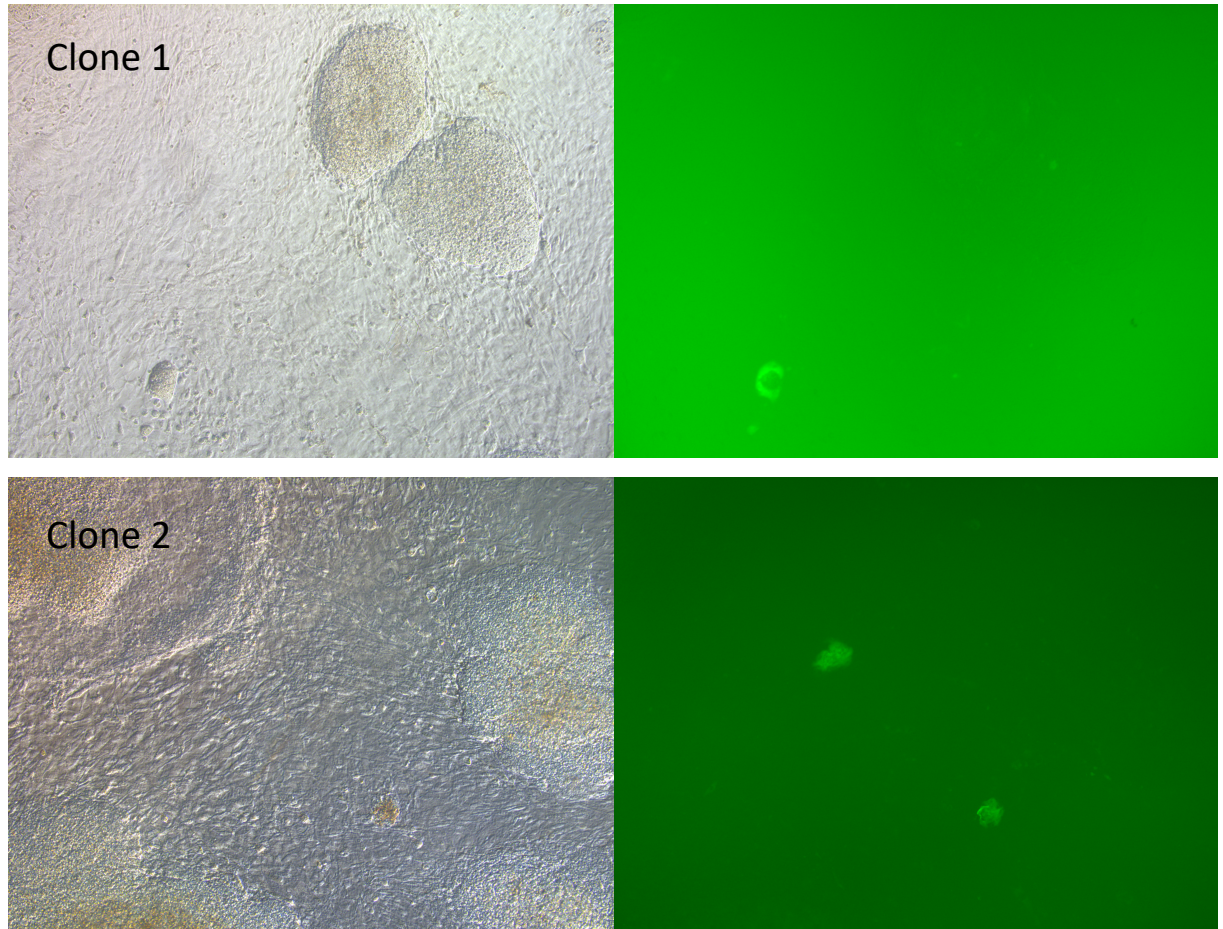


図 3-12 pCAG-EGFP-p53 ベクターを導入したマウス ES 細胞の蛍光顕微鏡像

Clone 1、Clone 2 それぞれ左右は同じ視野であり、左は明視野観察、右は緑色蛍光観察を行ったものである。Clone 1 の視野の右上に 2 個、Clone 2 の左上隅、右端に各 1 個、下端に 2 個大きなコロニーが見える。これらのコロニーで蛍光は見られなかったが、周辺の小さなコロニーで放射線照射後に蛍光が見られた。

3.2.3 ヒトの組織・臓器モデルにおける可視化に向けた検討

ヒト iPS 細胞は、皮膚線維芽細胞 NB1RGB から島田らによって樹立されたものを用いた(投稿準備中)。NB1RGB 細胞は理研細胞銀行から入手した。iPS 細胞の作製は Stemgent® StemRNA-NM Reprogramming Kit for Reprogramming Adult and Neonatal Human Fibroblasts (Reprocell 社)を用いて行った。iPS 細胞の培養は、培養液 NutriStem™ XF/FF (Reprocell 社)、iMatrix511 (ニッピ社)でコーティングした培養皿を用いて、37℃、5%CO₂ 存在下で行った。

導入は、Promega 社の Viafect 試薬および Thermo Fisher 社の Lipofectamine 2000 を用いたりポフェクション法にて行った。また、通常の細胞が培養皿に付着した状態での導入と、浮遊させた状態での導入を試みた。その結果、NB1RGB 細胞から樹立されたクローンの 1 つである NB1RGB C2 クローンにおいて、pEGFP-C1-p53 導入によって緑色蛍光が見られた。導入後 24-72 時間後に顕微鏡観察を行った結果を図 3-13 および図 3-14 に示す。いずれにおいても、全ての細胞ではないものの、核での(楕円状の)緑色蛍光が見られた。Viafect を用いた場合、DNA 量を 0.5 μ g としたときより、1 μ g とした時の方が多くの細胞で蛍光が見られた。また、蛍光を示した細胞は 24 時間後に比べて 48 時間後で増加したが、72 時間後では 48 時間後に比べて減少した。

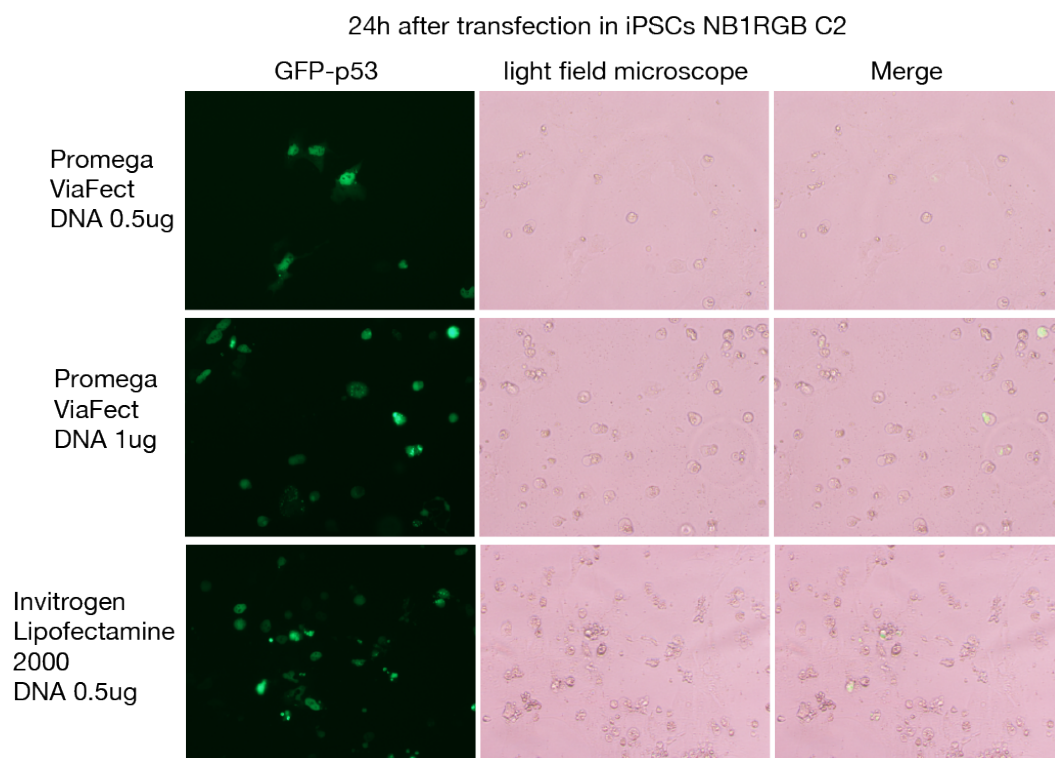


図 3-3 ヒト iPS 細胞クローン NB1RGB C2 に pEGFP-C1-p53 を導入後 24 時間の蛍光顕微鏡像

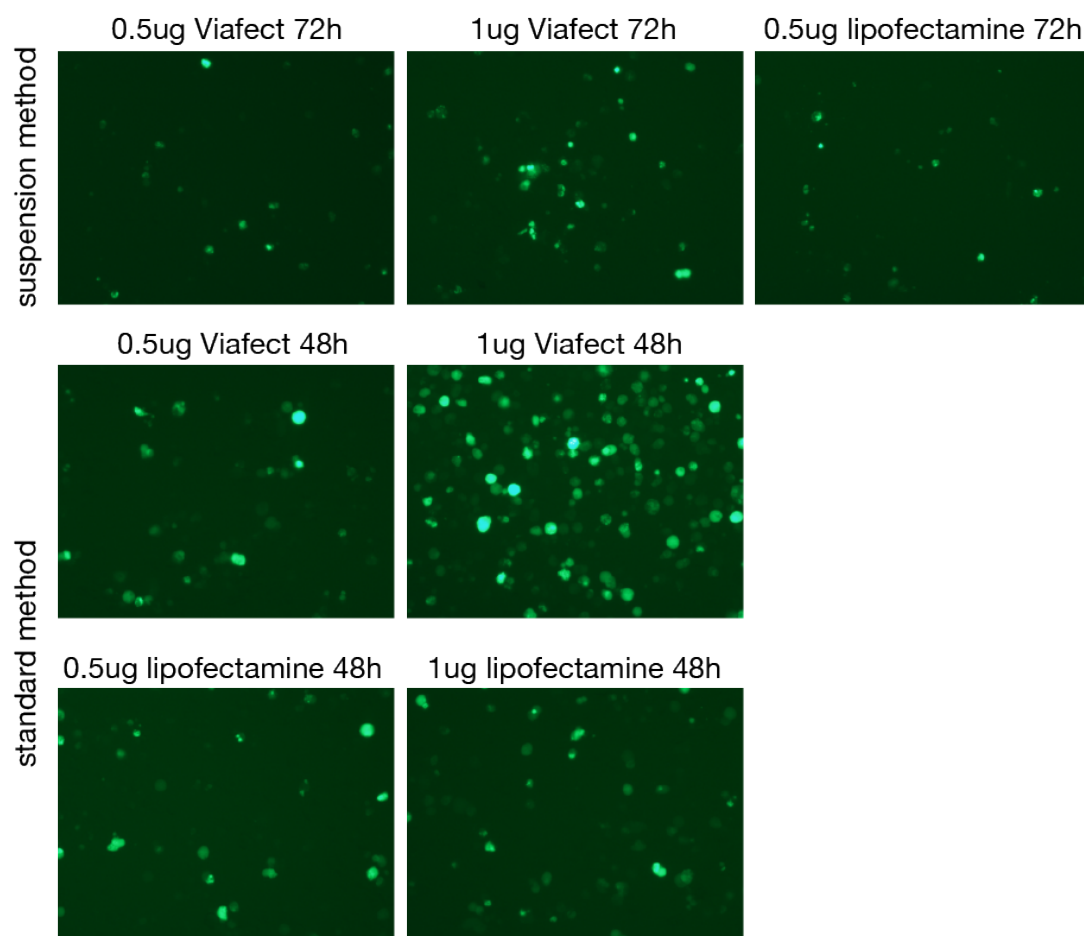


図 3-14 ヒト iPS 細胞クローン NB1RGB C2 に pEGFP-C1-p53 を導入後 48 および 72 時間の蛍光顕微鏡像

3.3 多様な生物種における DNA 損傷応答の可視化の可能性の予備的検討

ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、線虫、シロイヌナズナ、出芽酵母において p53-FP を用いた DNA 損傷応答の可視化の可能性について検討した。まず、それぞれの生物において p53、ATM、ATR に相当する分子に関して現在までに知られていることを整理し、放射線照射後の p53-FP の蛍光強度増加が見られるために必要な条件等について検討した。次に、それぞれの生物種において p53-FP の発現に適切と考えられるプロモーターを含むベクターを選定した。

3.3.1 各生物種における p53、ATM、ATR に関する情報

ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、線虫には、ヒト p53 に相当するタンパク質が存在し、DNA 損傷応答における機能が報告されている。p53 の分解を司る Hdm2 に相当する分子はゼブラフィッシュには存在するが、ショウジョウバエ、線虫では見つかっておらず、通常時および DNA 損傷時の制御機構に違いがあると考えられる。

シロイヌナズナを含む植物では、ヒト p53 に相当するタンパク質は見つかっていない。しかしながら、SOG1 という転写因子が存在し、DNA 損傷に応答して ATM、ATR によるリン酸化を受けること、リン酸化によって活性化され、種々の遺伝子の発現誘導を引き起こすことが報告されている。SOG1 は構造的にはヒト p53 と大きく異なるが、DNA 損傷応答における役割に関しては共通性も高いと考えられる。

ATM、ATR に関しては、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、線虫、シロイヌナズナ、出芽酵母の全てに存在し、DNA 損傷応答や修復における機能が報告されている。また、調べられている限り、ヒト ATM、ATR と似た生化学的性質を示し、グルタミンの N 末端側に隣接するセリンおよびスレオニンをリン酸化することが示されている。したがって、Hdm2 との結合の調節に関わる 15 番目のセリンをリン酸化できる可能性は極めて高いと考えられた。

上記を踏まえ、p53-FP を導入して放射線に応答した蛍光変化を起こさせるために必要な条件を検討した。ゼブラフィッシュの場合、Hdm2 に相当する分子が備わっているため、p53-FP のみの導入で実現できる可能性がある。しかしながら、ヒト p53 とゼブラフィッシュ Hdm2 間の親和性が低い可能性も考えられ、その場合には、ヒト Hdm2 の導入が必要になる場合もあると考えられた。ショウジョウバエ、線虫、シロイヌナズナ、出芽酵母では少なくとも p53-FP と Hdm2 を導入する必要があると考えられた。ただし、Hdm2 が存在しなくても、ATM、ATR 相当分子によるリン酸化が見られる可能性は十分にあると考えられた。

3.3.2 各生物種において p53-FP の発現のためのプロモーター、ベクターの選定

各生物種において、全ての組織・臓器にわたって、高い発現が可能なプロモーターを持つベクターを選定した。ゼブラフィッシュについては、EF1 α および β アクチンのプロモーターの制御下で、目的遺伝子の発現が誘導される pT20lactb ベクター[6]を選定した。ショウジョウバエについては、Upstream activator sequence (UAS) とヒートショックプロモーターの制御下で、目的遺伝子の発現が誘導される pUASattBw ベクターを選定した。シロイヌナズナでは、CaMV 35S プロモーター制御下での制御下で、目的遺伝子の発現が誘導される pRI201-AN ベクターを選定した。

出芽酵母に関しては、p53-FP cDNA をゲノム上の特定の場所に挿入する方針とした。線虫においては、p53 に相当する *Cep-1* 遺伝子に GFP が挿入された個体が、服部の共同研究者である鈴木芳代博士(量子科学技術研究開発機構)らによって作製されていることから、これを用いて予備的検討を行うこととした。

以上の検討結果を踏まえて、3.1.4 において、出芽酵母、シロイヌナズナ、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュにおける p53-FP の発現のためのベクター作製を実施した。

3.3.3 出芽酵母における p53-FP の発現の検討

3.1.1 で作製した EGFP-TP53-Yplac211 ベクターを出芽酵母に導入し、第 5 染色体の *URA3* 遺伝子座に挿入した。挿入した株と挿入前の株について、対数増殖期の細胞を二つに分け、片方は無処理サンプルとして何も加えず、もう片方については DNA 傷害誘発剤であるブレオマイシンを 20 unit/ml の濃度で 90 分処理した。これらの細胞中の p53-FP の発現、およびその 15 番目のセリンのリン酸化をウェスタン・ブロッティング法により検出を試みた。その結果、p53-FP を導入した株では p53 抗体に反応する強いシグナルが検出された。しかしながら、ブレオマイシン処理を施したサンプルに特異的な p53 の S15 リン酸化シグナルは観察されなかった。

3.3.4 線虫における p53 の放射線応答に関する検討

線虫の内在性の p53 の放射線に対する応答を解析するため、p53 に相当する *Cep1* 遺伝子に GFP が挿入された線虫(*cep-1::p53*)に放射線照射を行い、蛍光変化を観察した。線虫は餌となる大腸菌を塗布した寒天プレート上で飼育した。プレート上に卵から成虫までがいる状態で、量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所の食品照射棟内の照射設備にて 1,000Gy (45 分間) のコバルト 60 ガンマ線照射を行った。照射直後、および、2、6、12、4、28 時間後にプレートとともに蛍光顕微鏡で観察したが、蛍光の変化は見られなかった。線虫 *cep-1* の通常時および DNA 損傷時の制御機構は、ヒト p53 と違いがあると考えられた。

3.4 研究推進

各研究項目間の連携を密にするため、研究の進捗状況に応じて、随時メール連絡や対面での打合せを行いつつ、研究を進めた。研究組織全体での情報や方針の共有のため、研究開始直後の平成 29 年 10 月 19 日(木)に第 1 回委員会を開催し、研究の進め方について討議を行った。また、平成 30 年 3 月 28 日(水)に第 2 回委員会を開催し、本年度の成果と今後の展望について討議を行った。

さらに、本研究の成果に関連して、以下 3 件の学会発表を行った。この発表に関して、関連する研究者から有益なコメントを得るとともに、p53 の制御機構など関連する研究における最新の知見や動向に関する情報を入手することができた。

1. ○塚田 海馬, 島田 幹男, 松本 義久. DNA 損傷応答可視化へ向けた GFP-p53 融合タンパク質の発現と挙動の解析. 日本放射線影響学会第 60 回大会, 平成 29 年 10 月 25~28 日, 京葉銀行文化プラザ(千葉), YA04-5.
2. ○Kaima Tsukada, Mikio Shimada, Yoshihisa Matsumoto. In situ visualization system for DNA damage response in human cells based on p53 regulation mechanism. 33rd International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University, Co-op Inn Kyoto (Kyoto), 4-5 December 2017, P-18.
3. ○塚田 海馬, 島田 幹男, 松本 義久. ヒト細胞内における GFP-p53 融合タンパク質を利用した DNA 損傷応答可視化システム. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 平成 29 年 12 月 6~9 日, 神戸ポートピア(神戸), 1P-1422.

4. 結言

この研究では、ヒトがん抑制遺伝子で、DNA 損傷応答を司る p53 の制御の分子機構を利用し、真核生物全般にわたって適用可能で、かつ生きたままで見ることができる DNA 損傷応答可視化システムの開発を目標とし、その実現性に関する基礎的な検討を行った。

本年度においては、まず、緑色蛍光タンパク質とヒト p53 の全長の融合タンパク質を発現する基本ベクター pEGFP-C1-p53 を構築し、ヒト培養細胞において放射線照射による蛍光強度増加が見られることを確認した。この pEGFP-C1-p53 ベクターを元に、マウスにおける p53-蛍光タンパク質融合タンパク質 (p53-FP) 発現のための pCAG-GFP-p53 ベクターの構築を行った。続いて、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) およびヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) に p53-FP 発現ベクターを導入し、今後の放射線応答の観察や解析に適切と考えられるクローンを選別した。さらに、脊椎動物 (ゼブラフィッシュ)、無脊椎動物 (ショウジョウバエ、線虫)、植物 (シロイヌナズナ)、単細胞生物 (酵母) をモデルとして、DNA 損傷応答可視化システムの実現のための予備的検討やベクター構築を行った。

以上、1 カ年計画の 1 年目である本年度の業務項目を実施し、所期の目標を達成した。

5. 参考文献

1. Wanotayan R, Fukuchi M, Imamichi S, Sharma MK, Matsumoto Y. Asparagine 326 in the extremely C-terminal region of XRCC4 is essential for the cell survival after irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **457**, 526–531 (2015).
2. Fukuchi M, Wanotayan R, Liu S, Imamichi S, Sharma MK, Matsumoto Y. Lysine 271 but not lysine 210 of XRCC4 is required for the nuclear localization of XRCC4 and DNA ligase IV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **461**, 687–694 (2015).
3. Komiyama S, Taniguchi S, Matsumoto Y, Tsunoda E, Ohto T, Suzuki Y, Yin H-L, Tomita M, Enomoto A, Morita A, Suzuki T, Ohtomo K, Hosoi Y, Suzuki N. Potentiality of DNA-dependent protein kinase to phosphorylate Ser46 of human p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**, 816–822 (2004).
4. Ryu J-Y, Siswanto A, Harimoto K, Tagawa Y. Chimeric analysis of EGFP and DsRed2 transgenic mice demonstrates polyclonal maintenance of pancreatic acini. *Transgenic Res.*, **22**, 549–556 (2013).
5. Tamai M, Yamashita A, Tagawa Y. Mitochondrial development of the in vitro hepatic organogenesis model with simultaneous cardiac mesoderm differentiation from murine induced pluripotent stem cells. *J. Biosci. Bioengineer.*, **112**, 495–500 (2011).

参考資料：用語の説明

p53：p53とは「分子量53k(53,000)のタンパク質」の意味である。霊長類のがんウイルスSV40に特徴的なタンパク質であるラージT抗原に結合するタンパク質として発見され、その分子量からこの名称がつけられた。機能が未知であったため無機質な名称が付けられて今日に至っているが、極めて重要ながん抑制タンパク質である。当初はラージ T抗原と協働して細胞をがん化させるタンパク質だと考えられた。さらに、がん組織切片をp53抗体で染色すると、多くのがんでp53の増加が認められたことでこの考えが後押しされた。しかし、1980年代終盤に、p53の機能はこれとは全く逆でがんを抑制することが明らかになった。現在では、ラージT抗原はp53に結合してこれを不活化する、また、がん組織ではp53の機能が失われてHdm2の発現が起これないため、p53が分解されずに蓄積すると考えられている。

Hdm2：マウスの腫瘍で発見された二重微小染色体(double minute chromosome)上に遺伝子が存在するタンパク質Mdm2 (murine double minute 2)にあたるヒトタンパク質。Mはマウスを意味するためこのように呼ばれるが、ヒトの二重微小染色体上に遺伝子が存在するという意味ではないので、やや奇異な呼び方である。実体はp53を主な基質とするユビキチンリガーゼ(E3)である。

ATM (Ataxia-telangiectasia Mutated) : Ataxia-telangiectasia は毛細血管拡張性運動失調症で、網膜などでの血管拡張と小脳性運動失調を主症状とする遺伝的疾患。また、患者細胞は放射線高感受性を示す。この疾患の原因遺伝子が ATM であり、その産物はタンパク質リン酸化酵素で、DNA 二重鎖切断のセンサーであると考えられている。Nbs1-Mre11-Rad50(NMR)複合体によって、DNA 二重鎖切断部位に動員される。

ATR (ATM and Rad3-Related) : ATM とともに Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (PIKK)ファミリーを形成するタンパク質リン酸化酵素であり、一本鎖 DNA(不対合 DNA)のセンサーであると考えられている。RPA、ATRIP を介して1本鎖DNAに結合する。なお、PIKKファミリーには、この他に、もう一つのDNA二重鎖切断センサーであるDNA-PKcsがある。

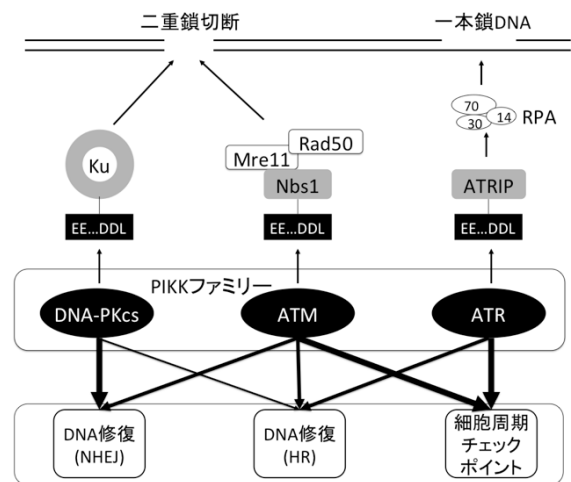


図 A1 DNA 損傷センサーDNA-PK、ATM、ATR

細胞周期チェックポイント：DNA複製が完了するまで、染色体分配を行わないことを保証する機構。また、DNA損傷が生じた際に、その修復が完了するまで、DNA複製や染色体分配を一時停止する機構。G1チェックポイント、S期チェックポイント、G2/Mチェックポイントがある。ATM、ATR、p53が重要な役割を担う。

アポトーシス：多細胞生物の発生過程や日常の営みにおいて、不要あるいは有害な細胞に自ら死を促し、除去する機構。たとえば、手足の水かきの部分の細胞がアポトーシスを起こすことにより、指が互いに離れ、独立に動くようになる。その他、ウイルスに感染した細胞や免疫系において自らに反応する抗体を産生する細胞がアポトーシスを起こす。放射線照射後では、特にリンパ球のアポトーシスが顕著である。これは不完全あるいは不正確なDNA損傷修復により、遺伝情報に変化をきたし、がんにつながる可能性を防ぐための機構であると考えられる。ここでもp53が重要な役割を担う。

リン酸化：ここではタンパク質のリン酸化。タンパク質の翻訳後修飾の一つで、セリン、トレオニン、チロシンの水酸基にアデノシン三リン酸(ATP)からリン酸基が転移され、エステル結合が形成される(図 A2)。細胞内のさまざまな情報伝達(例：細胞外からの増殖因子による刺激)、制御(例：細胞周期進行)において重要な役割を演じる。

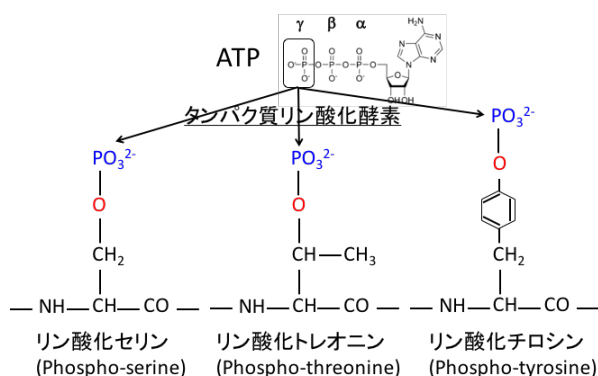


図 A2 タンパク質リン酸化

ユビキチン化：ユビキチンは 76 アミノ酸からなる小さなタンパク質。これが他のタンパク質の側鎖(リシン)に付加されるのがユビキチン化である。ユビキチン化によってタンパク質のさまざまな機能調節が行われるが、その中で重要なものの一つが、プロテアソームによるタンパク質分解を促すことである。ユビキチン化は3段階で行われる。①ユビキチン活性化酵素(E1)がATP 依存的にユビキチンのC末端のカルボキシル基をアデニル化し、続いて、自らのシステイン残基にチオエステル結合させる。②ユビキチンがユビキチン活性化酵素(E1)からユビキチン転移酵素(E2)のシステイン残基に受け渡される。③ユビキチン転移酵素(E2)が直接または間接に基質タンパク質にユビキチンを結合させる。ここで E3 は E2 と基質タンパク質の両方に結合し、ユビキチンの受け渡しを促進する。上記のように、本研究計画において、p53 が基質にあたり、Hdm2 が E3 に当たる。

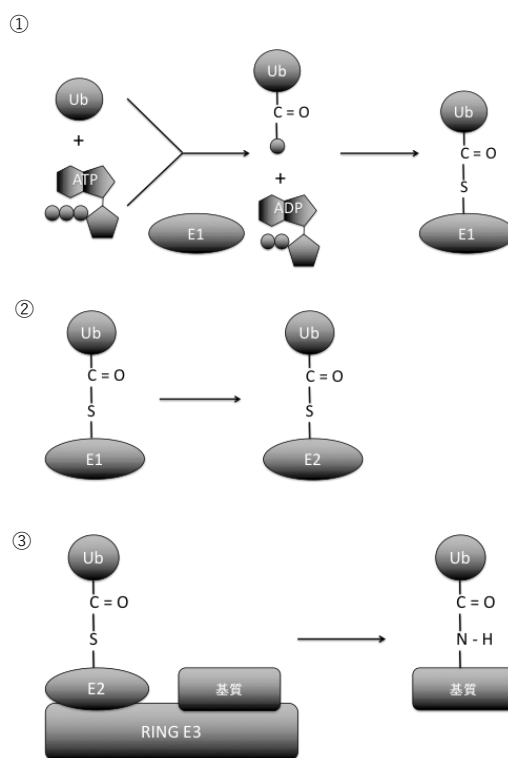
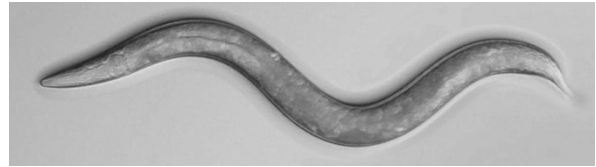


図 A3 タンパク質ユビキチン化

ゼブラフィッシュ：ゼブラフィッシュは、非常に有用な脊椎動物のモデル生物として確立され、近年は、特にヒトの疾病モデルとしての利用が注目されている。飼育も容易、体外で発生し、非常に多産であり、世代時間も短い(3ヶ月程度)。全ゲノムも解明されている。体も小さく(体長5cm程度)、組織が透明であるため、蛍光トランスジェニックを用いたライブセルイメージングや、ケミカルバイオロジー解析に威力を発揮する。



線虫：線形動物門に属するモデル生物。ここで用いたのは線虫のうち、*Caenorhabditis elegans* 種。体長は約 1mm、体細胞数は 959 個（雌雄同体の場合）で、全ての細胞の系譜、位置、細胞間の物理的な接続構造が既知である。そのため、多細胞生物の組織、臓器の形成やその過程での細胞分化、細胞死（アポトーシス）の分子機構解明に多くの知見をもたらしている。さらに、RNA 干渉現象も最初に線虫で発見された。神経細胞数は 302 個であり、神経系のモデル生物としても有用である。また、放射線が学習や運動機能へ及ぼす影響を調べるためにも用いられている。



ショウジョウバエ：ここで用いたのは、キイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）。体調は 3mm 程度と小さく、世代時間が 10 日程度と短い。古くから遺伝学の研究材料として用いられ、Muller の X 線による突然変異誘発の発見をもたらした。以来、多くの突然変異体が作製され、ホメオボックス遺伝子の発見をはじめ、多細胞生物の発生、形態形成過程の分子機構解明に重要な貢献をしている。神経回路網形成、軸索投射の研究においても重要な知見をもたらしており、また、概日リズム（サーカディアンリズム）の発見の端緒ともなった。

シロイヌナズナ：アブラナ科の一年草で、現在、最も良く用いられているモデル植物。栽培が容易で、世代時間が短い（最短 6 週間程度）。形質転換（アグロバクテリウムを用いる）やゲノム編集が容易である。ゲノムサイズは 1.3 億塩基対と小さく、2000 年に植物として初めて全ゲノム解読が終了した。変異体も充実しており、種子植物の器官形成や恒常性維持の分子機構解明に多くの知見をもたらしている。



酵母：代表的なモデル生物として、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* がある。単細胞生物で培養しやすいこと、増殖が速い（2-3 時間程度）ことに加え、遺伝学的にユニークで優れた特徴をいくつか持つ。この特徴を利用し、真核細胞の基本的な生命活動、例えば、細胞周期、DNA 複製・組換え・修復、細胞内情報伝達、オートファジーなどの分子機構の解明に大きく貢献している。