

# がん抑制タンパク質 p53 による NF- $\kappa$ B 活性化経路の制御機構

笠井理恵子, 土谷 佳弘

## Control Mechanism of NF- $\kappa$ B Activation Pathway by Tumor Suppressor Protein p53

Rieko KASAI and Yoshihiro TSUCHIYA

### 要 旨

#### 【目的】

NF- $\kappa$ B (RelA/p50複合体) は炎症反応を制御する重要な転写因子であり, その活性はリン酸化酵素である I $\kappa$ B キナーゼ  $\beta$  (IKK $\beta$ ) により制御されている。腫瘍壊死因子 (TNF $\alpha$ ) 等の炎症性サイトカインが TNF $\alpha$  受容体に結合すると, IKK $\beta$  の活性化が誘導され, 最終的に活性化された NF- $\kappa$ B は様々な遺伝子発現を誘導し, 一過性の炎症を制御する。一過性の炎症の際, NF- $\kappa$ B シグナル経路は転写を介して Inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ), A20 (脱ユビキチン化酵素), CYLD タンパク質によってネガティブフィードバックされる。しかし, 持続的に炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ ) が受容体に結合し続けると, IKK $\beta$  が活性化 (リン酸化) され続け, 炎症が持続的に起こる。がんや循環器系疾患などの非感染性疾患 (生活習慣病) には NF- $\kappa$ B シグナルを介した慢性炎症が要因の 1 つであると考えられており, NF- $\kappa$ B シグナルの制御機構の解明により生活習慣病の予防・治療に繋がることが期待されている。

NF- $\kappa$ B と同じ転写因子であるがん抑制タンパク質 (p53) は, 通常ではユビキチンリガーゼ (Mdm2) により分解され, タンパク質量が少なく調整されている。しかし, 紫外線や放射線照射により DNA が損傷すると p53 は活性化される。活性化した p53 はタンパク質量が増加し, 傷害された細胞の細胞周期の停止やアポトーシスを誘導し, 細胞のがん化を抑制すると考えられている。これまでに NF- $\kappa$ B シグナルと p53 シグナルは互いに抑制しあう関係にあり, NF- $\kappa$ B の RelA とがん抑制タンパク質 p53 が核内でヒストンアセチル化酵素 (CBP) を取り合うことにより, 転写活性が制御されていることが報告されている。しかし, p53 による NF- $\kappa$ B の詳細な制御機構は解明されていない。

先行研究から, 転写活性非依存的に RelA の転写活性化ドメイン (TAD) が IKK $\beta$  の活性化を抑制し, NF- $\kappa$ B シグナル経路を負に制御していることが示唆された。多くの転写因子の構造には TAD 領域があり, p53 にも保存されていることが構造解析プログラムから予想された。そこで本実験では, p53 の TAD 領域に着目し, p53 による NF- $\kappa$ B の新たな抑制機構について解析を行った。

#### 【方法】

ルシフェラーゼアッセイを GP2-293細胞 (アデノウイルス 5 型 DNA で形質転換したヒト胎児腎細胞) に F-vector (遺伝子なし), Flag-p53 WT, p53点変異体 [Flag-p53LLL/AAA], p53欠損変異体 [Flag-p53 (1-101), Flag-p53 (102-292), Flag-p53 (293-393)], RelA 欠損変異体 [Flag-RelA (286-551)], CBP のプラスミドと, NF- $\kappa$ B が結合する塩基配列とルシフェラーゼ遺伝子の配列を持つ pNF- $\kappa$ B Luc のルシフェラーゼプラスミドをトランスフェクション法で細胞内へ導入し, 24時間培養

後、細胞の可溶化液を回収した。ルシフェラーゼを発現した細胞可溶化液とルシフェラーゼの基質であるルシフェリンと反応させて化学発光を起こし、発光量を測定することで、NF- $\kappa$ B の活性化を定量した。

GP2-293細胞に F-vector (遺伝子なし)、p53点変異体 (LLL/AAA)、Flag-RelA (286-551) をトランスフェクション法で細胞内に導入し、24時間培養後、タンパク質抽出液を回収した。SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、リン酸化 IKK $\beta$  抗体 (P-IKK $\beta$  (ser176/ser180))、Flag 抗体、HA 抗体、actin 抗体を用いてウエスタンブロッティング法により目的のタンパク質を検出した。

#### 【結果および考察】

TNF $\alpha$  刺激により NF- $\kappa$ B の活性化が誘導される条件下において、p53 WT を発現させると NF- $\kappa$ B の活性化が抑制されることが確認された。さらに、【p53 (1-101) : 転写活性化領域 (TAD)】、【p53 (102-292) : DNA 結合領域 (DBD)】、【p53 (293-393) : 四量体形成領域 (TD) と塩基性領域 (BD)】の3つの領域で比較すると NF- $\kappa$ B の転写活性は p53-TAD により最も抑制されることが判明した。ウエスタンブロッティング法で IKK $\beta$  のリン酸化 (P-IKK $\beta$ ) を解析したところ、p53 WT、p53-TAD により P-IKK $\beta$  の量が抑制されていることが確認された。これらのことから、p53は TAD を介して IKK $\beta$  のリン酸化が抑制され、NF- $\kappa$ B の活性化を負に制御していることが示唆された。

先行研究から RelA の LxxLL モチーフが IKK $\beta$  のリン酸化を抑制していることが明らかとなっており、p53の TAD 領域においても LxxLL モチーフが保存されている。よって、p53の TAD に保存されている LxxLL モチーフが IKK $\beta$  のリン酸化を抑制し、NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することが示唆された。実際に、p53の LxxLL モチーフにおける点変異体は NF- $\kappa$ B の活性抑制効果がわずかに減弱することが確認された。

核内での経路は関与していないことが示唆されたことから、細胞質における制御に着目し、NF- $\kappa$ B 活性化経路の上流である IKK $\beta$  の脱リン酸化酵素の関与について解析を行なった。脱リン酸化阻害剤であるオキサ酸を添加して、PP2A の関与について解析を行なったところ、オキサ酸処理により p53-TAD の抑制効果が減弱することが明らかとなった。このことから、このことから、p53-TAD が脱リン酸化酵素と協調して P-IKK $\beta$  を負に抑制することが示唆された。

キーワード : NF- $\kappa$ B, p53, IDP

## 序 論

### NF- $\kappa$ B の活性化経路

NF- $\kappa$ B は RelA と p50 の二量体である。NF- $\kappa$ B は未刺激の状態では細胞質に存在しており TNF $\alpha$  刺激によって核に移行することで活性化される。未刺激時には NF- $\kappa$ B は I $\kappa$ B $\alpha$  などの阻害タンパク質と結合して細胞質に存在している。細胞が TNF $\alpha$ 、インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、リポポリサッカライド (LPS) などによって刺激されると、IKK (I $\kappa$ B kinase) 複合体が活性化され、NF- $\kappa$ B 阻害タンパク質 (I $\kappa$ B $\alpha$  など) をリン酸化する。リン酸化では、I $\kappa$ B $\alpha$  の中のセリンというアミノ酸の側鎖の水酸基 (-OH) にリン酸が付加される。次にこのリン酸の付加により I $\kappa$ B $\alpha$  のリジンの側鎖のアミノ基 (-NH) にユビキチンという76アミノ酸から成るペプチドが鎖状に多数付加される。このようにタンパク質の翻訳が完了した後にリン酸や、ユビキチンのような

分子が付加することを「翻訳後修飾」と言い、リン酸が付加することをリン酸化、ユビキチンが付加することをユビキチン化と言う。その結果、I $\kappa$ B $\alpha$  が分解されることで、NF- $\kappa$ B が阻害タンパク質から遊離し、阻害タンパク質によって隠されていた核移行シグナル（NLS）が表に出て、NF- $\kappa$ B が核に移行して活性化される（図1）。

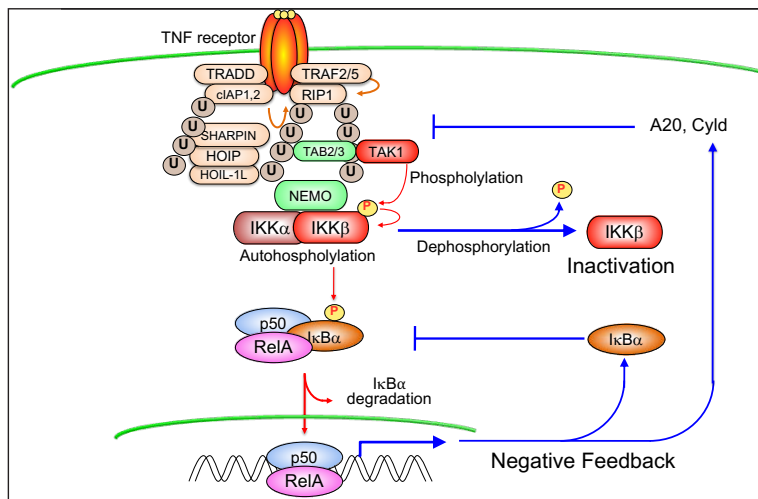


図1 NF- $\kappa$ B の活性化経路

刺激依存的な I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化 IKK に関与するのは、IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , NEMO の3種のタンパク質から構成されている IKK 複合体である。IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  がリン酸化酵素だが、I $\kappa$ B $\alpha$  をリン酸化するのは IKK $\beta$  であると考えられている。NEMO はリン酸化酵素としての活性を持っておらず IKK 複合体の活性調節因子であると考えられている<sup>1,2,7)</sup>。

IKK $\beta$  はセリンスレオニンタンパク質キナーゼであり、転写因子 NF- $\kappa$ B 複合体の阻害剤である I $\kappa$ B $\alpha$  タンパク質をリン酸化する。I $\kappa$ B $\alpha$  タンパク質のリン酸化によりユビキチン化経路を通じてこの分解が誘発され、NF- $\kappa$ B 複合体が活性化される。IKK $\beta$  活性は TNF $\alpha$  や IL1 により刺激され、IKK $\beta$  はヘテロ二量体を形成して TAK1 と相互作用する。

### NF- $\kappa$ B のネガティブフィードバック機構

NF- $\kappa$ B の活性化状態は約1時間であり、ネガティブフィードバックによって速やかに負に制御されている。NF- $\kappa$ B の活性化されると I $\kappa$ B $\alpha$  や A20 といった NF- $\kappa$ B 阻害因子が発現し、NF- $\kappa$ B の働きを抑制することが知られている。I $\kappa$ B $\alpha$  や A20 の働きは、遺伝子の転写レベルにおいて NF- $\kappa$ B により転写制御されている。I $\kappa$ B $\alpha$  は、NF- $\kappa$ B 転写因子を阻害する機能を有するタンパク

質の一つである。IkB $\alpha$  は、NF- $\kappa$ B タンパク質の核移行シグナル (NLS) をマスクし、細胞質内の不活性化状態に隔離しておくことによって、NF- $\kappa$ B を阻害する。つまり、NF- $\kappa$ B が活性化されると、NF- $\kappa$ B は IkB $\alpha$  や A20 を活性化し、NF- $\kappa$ B が不活性化されるという負のフィードバック制御機構が存在する (図 2)。

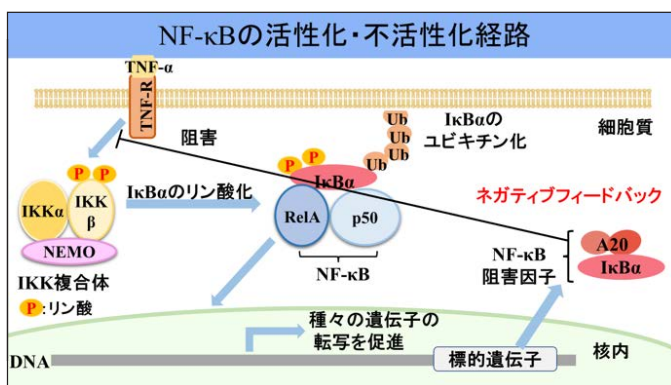


図2 NF- $\kappa$ B のネガティブフィードバック機構

ネガティブフィードバックは初めに、NF- $\kappa$ B にストレスが加わり、IKK 複合体が活性化され IkB $\alpha$  をリン酸化する。リン酸化をきっかけに IkB $\alpha$  がユビキチン化され、プロテアソームによって分解される。IkB $\alpha$  が分解されることで NF- $\kappa$ B が核内に移行できるようになり、特定の遺伝子プロモーターに結合して、炎症誘発性または抗炎症性のタンパク質の発現を調節する。NF- $\kappa$ B が活性されると IkB $\alpha$  の発現が活性化されることで、ネガティブフィードバックが起こり、活性化が抑制される<sup>3,4,5,6)</sup>。

### RelA-TAD による NF- $\kappa$ B 活性化の抑制

土谷研究室の先行研究で RelA は TAD 領域に PP2A や Hsp70 が結合して IKK $\beta$  の脱リン酸化を誘導し、NF- $\kappa$ B の活性を負に制御する新たなネガティブフィードバック経路が存在することが明らかとなっている。興味深いことに RelA は転写活性を介さずに細胞質において IKK $\beta$  の脱リン酸化を誘導することが示唆されている (図 3)。ネガティブフィードバック機構が駆動しない RelA 欠損細胞を TNF $\alpha$  で刺激すると IKK $\beta$  の持続的な活性化が誘導される。そこで、RelA 欠損細胞に野生型 RelA と転写活性を保持していない RelA 欠損変異体を用いた再構成実験を行った。驚くべきことに、転写活性を保持していない RelA 変異体でも IKK $\beta$  の活性を抑制することが判明した。さらに、この抑制には PP2A を介した脱リン酸化反応が関与していることが示唆されている<sup>8)</sup>。RelA の欠失変異体を用いた解析より、RelA は TAD を介して脱リン酸化酵素

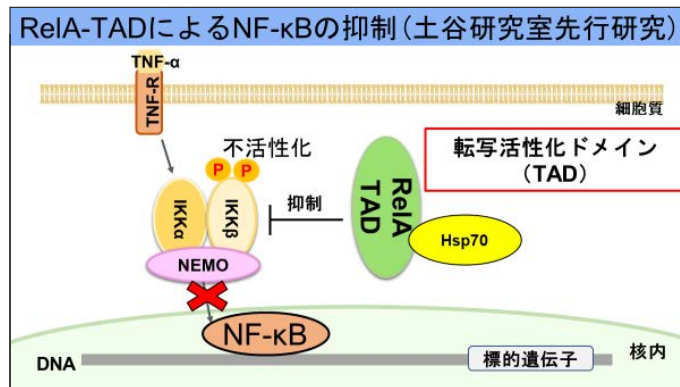


図3 RelA-TAD による NF- $\kappa$ B の抑制 (土谷研究室先行研究)

PP2A と IKK $\beta$  の結合を亢進し、ネガティブフィードバックの役割をになうことが判明している。これらのことから、RelA は転写活性を介した経路と転写活性非依存性の直接的な機能により IKK $\beta$  活性を制御することが示唆された。

### がんのイニシエーションとプロモーションについて

がんの発生段階として、第1段階にイニシエーション、第2段階にプロモーション、第3段階にプログレッションが起こる。イニシエーションとは、通常の細胞に DNA 損傷が起き、がん細胞が変異することである。イニシエーションの段階では、p53によってがん細胞の変異を抑制している (図4)。

プロモーションとは、変異したがん細胞が増殖することである。プロモーションの段階では、p53はがん細胞の増殖を抑制し、NF- $\kappa$ B はがん細胞の増殖を促進している。プロモーションで

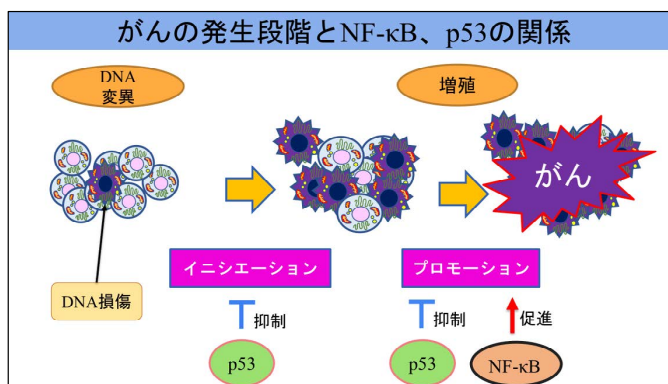


図4 がんの発生段階と NF- $\kappa$ B, p53 の関係

変異したがん細胞が増殖し、その後のプロGRESSIONで変異、増殖したがん細胞が細胞自身で血管新生を起こし、血管を通過して様々な場所へ転移が起こる。プロGRESSIONでは、NF- $\kappa$ B によって炎症反応が促進される<sup>9)</sup>。

### がん抑制タンパク質 p53の機能について

転写因子の一種である p53は、分子量53kD、393個のアミノ酸から構成されているがん抑制遺伝子の1つである。p53はヒトのがんの約50%に変異が認められ、がんの発症に重要な役割を担っていることが広く知られている。p53の主な作用として、細胞死をとめるための細胞周期の停止、アポトーシスの誘導、DNAの修復、がん細胞の転移／血管新生の阻害などがあり、これらの作用が、がんを抑制する方向に働くと考えられている。通常 p53は、ユビキチン-プロテアソーム経路によって分解されている。しかし、DNA 障害や抗がん剤処理などによって p53が増加すると、CBP（コアクチベータ）が p53に結合する可能性が高まることで、NF- $\kappa$ B の活性が抑制されることにより、異常な細胞のアポトーシスが誘導され、がん発症を抑制する<sup>10,11)</sup>（図5）。

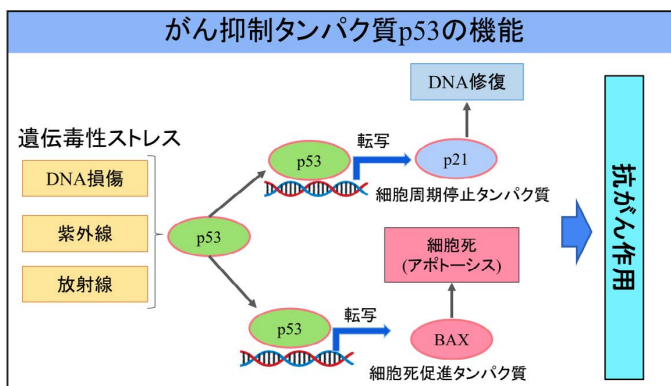


図5 がん抑制タンパク質 p53の機能

### NF- $\kappa$ B と p53の関係性

NF- $\kappa$ B と p53は共に転写因子であり、NF- $\kappa$ B は発がん性に関与し、p53はがんの抑制に関与している遺伝子のため、双方で阻害しあっている。また、IKK $\beta$  は NF- $\kappa$ B の活性化に作用し、逆に p53の活性化を阻害する働きがあると考えられている<sup>12)</sup>（図6）。

また NF- $\kappa$ B と p53は、CBP（コアクチベータ）を取り合うことで、互いを抑制しあっている。CBP とはヒストンアセチル化酵素であり、DNA 中のヒストンにアセチル基（CH<sub>3</sub>CO-）が結合することで、クロマチン構造が緩み、転写が促進される。このように、NF- $\kappa$ B または p53は CBP と結合することで転写活性が増加し、それぞれの標的遺伝子の発現を促進させる<sup>13)</sup>（図7）。



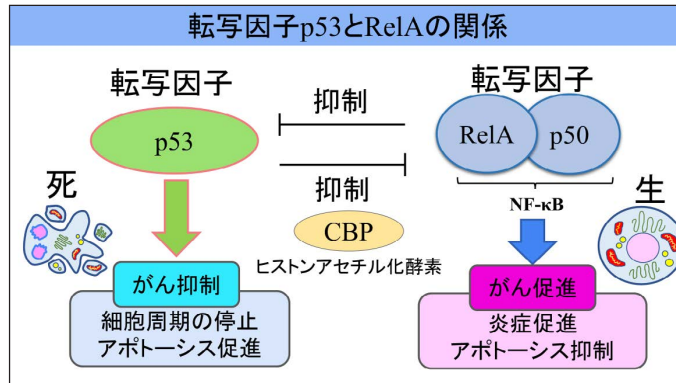


図6 NF- $\kappa$ B と p53 の関係性

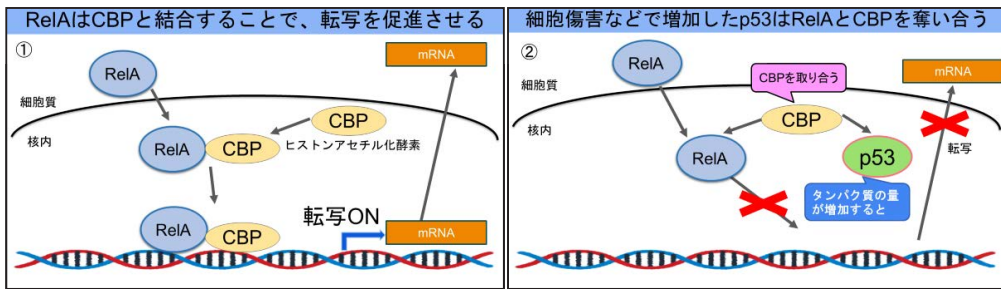


図7 RelA と CBP, p53 と CBP の関係性

### 転写因子 p53 と RelA の構造と天然変性タンパク質 (IDP)

p53 は全長 1 ～ 393 アミノ酸で構成され、1 から 101 までの TAD 部分、102 から 292 までの DBD 部分、293 から 393 までの TD、BD 部分に分けられる<sup>10)</sup>。RelA は N 末側に DNA 結合ドメイン (RHD) とよばれる DNA 結合ドメインをもち、C 末側に転写活性ドメイン (TAD) がコードされている (図 8)。

天然変性タンパク質 (IDP) は生体条件下で三次構造をもたず、二次構造をとることもほとんどなく、鎖が伸びた状態のタンパク質である。IDP は、完全に構造をとらない状態から部分的に構造をとる状態までをカバーし、ランダムコイルや柔軟なリンカーで連結された複数ドメインタンパク質などが含まれている。IDP は古典的な「鍵と鍵穴」モデルとは異なり、「会合に共役した折りたたみ」反応により低親和性にもかかわらず高い特異性でタンパク質と会合する性質によりシグナル伝達のハブ (結節点) として機能する<sup>14)</sup>。

高等生物の転写因子は立体構造をとる DNA 結合ドメイン (DBD) と、IDP 領域の転写活性化ドメイン (TAD) で構成される。RelA や p53 の TAD は IDP の構造をとることが知られてい

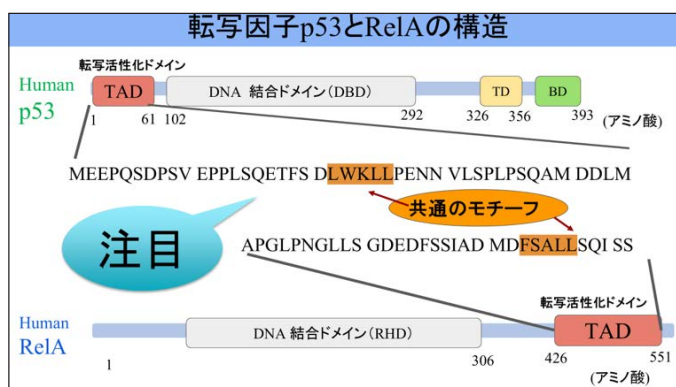


図8 転写因子 p53 と RelA の構造

る。RHD は規則的な形を有しているため安定しているが、TAD はIDP のため不規則な形を有しているため、不安定である<sup>15)</sup>。

転写活性ドメイン (TAD 領域) とは転写活性を有する領域であり、その領域には天然変性タンパク質が存在していることが明らかになっている。天然変性タンパク質は特殊な疎水性アミノ酸 LxxLL モチーフが存在しており、これらは転写活性の抑制に関与していると言われている<sup>16)</sup>。LxxLL モチーフは核内転写因子・転写共役因子・核内受容体の会合を介在するモチーフである (図9)。

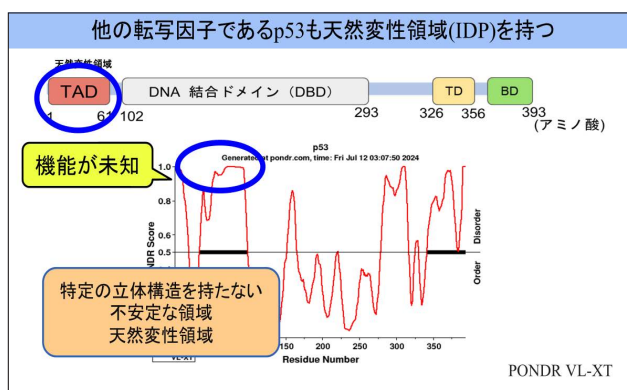


図9 p53の天然変性タンパク質 (IDP) 領域

### p53-TAD を介した IKK $\beta$ のリン酸化, NF- $\kappa$ B の活性化の制御機構

これまでの転写因子の研究は、細胞内シグナルを介した遺伝子発現の作用機序の解析に焦点が置かれている。しかし、本実験では、核内ではなく細胞質の転写因子 p53 の TAD が転写活性



化とは異なるハブとしての機能を有することに着眼点をおいている。これまで先行研究で、NF- $\kappa$ B の TAD 領域に存在する LxxLL モチーフが IKK $\beta$  のリン酸化を阻害させることが明らかになっている。本実験では p53 の TAD 領域にもアミノ酸モチーフである天然変性領域の LxxLL が存在するため、p53 の TAD を介して IKK $\beta$  のリン酸化や NF- $\kappa$ B の活性化を負に制御する機能を有するのか解析を行なった (図10)。

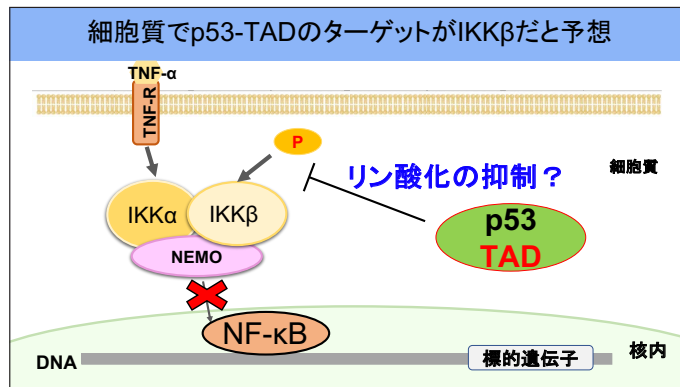


図10 p53-TAD を介して IKK $\beta$  のリン酸化や NF- $\kappa$ B の活性が負に制御されるのか

## 試 薬

- ・  $\beta$ -glycerophosphate (ナカライテスク)
- ・ 1 % TritonX-100 (ナカライテスク)
- ・ Acrylamide (ナカライテスク)
- ・ Anti-mouse HRP-linked Antibody (Cell Signaling TECHNOLOGY)
- ・ Anti-rabbit HRP-linked Antibody (Cell Signaling TECHNOLOGY)
- ・ APS (ナカライテスク)
- ・ BSA (SIGMA)
- ・ DMEM (ナカライテスク)
- ・ DTT (Thermo SCIENTIFIC)
- ・ ETB (シグマアルドリッチジャパン)
- ・ FBS (EQUITECH-BIO・INC)
- ・ Glycine (シグマアルドリッチジャパン)
- ・ MgCl<sub>2</sub> (ナカライテスク)

- ・ NaF (富士フィルム和光純薬)
- ・ N-N'-Methylenebisacrylamide (ナカライテスク)
- ・ N, N, N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (富士フィルム和光純薬)
- ・ Opti-MEM (Thermo SCIENTIFIC)
- ・ Phospho-IKK $\alpha/\beta$  (Ser176/180) (16A6)/rabbit (Cell Signaling TECHNOLOGY)
- ・ PI (Protease Inhibitor cocktail) (ナカライテスク)
- ・ SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo SCIENTIFIC)
- ・ Super Signal West Femto Trial Kit (Thermo SCIENTIFIC)
- ・ Super Signal West Femto Luminol Enhancer Solution (Thermo SCIENTIFIC)
- ・ Super Signal West Femto Luminol Stable Peroxide Solution (Thermo SCIENTIFIC)
- ・ TEMED (富士フィルム和光純薬)
- ・ Thermo Scientific Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific)
- ・ Tris (hydroxymethyl) aminomethane (ナカライテスク)
- ・ Trizma<sup>®</sup>base (Tris) (シグマアルドリッチジャパン)
- ・ Tween20 (シグマアルドリッチジャパン)
- ・ Water (ナカライテスク)
- ・ メタノール (シグマアルドリッチジャパン)
- ・ トリパンブルー溶液 (和光純薬工業)
- ・ スキムミルク (ナカライテスク)
- ・ ホタルルシフェラーゼ (LAR II) (Promega)
- ・ ウミシイタケ (Stop & Glo) (Promega)

## 方 法

### 細胞培養

#### 【細胞株】

GP2-293細胞 (アデノウイルス 5 型 DNA で形質転換したヒト胎児腎細胞) MEF 細胞 (マウス胎児由来線維芽細胞) を10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中で37℃, 5 % CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

#### 【細胞培養】 6 cm dish の場合

1. 細胞の状態 (バクテリアやカビなどのコンタミがないか) と細胞密度を位相差顕微鏡で観

察する。

2. アスピレータースイッチを入れ、シリンジで培養容器内の培地を吸い取って捨てる。
3. 3 ml の PBS (-) ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  不含 PBS) で細胞を洗う。強固に接着している細胞は何回か繰り返す。
4. 0.5 ml のトリプシン/PBS で洗う。細胞表面を満遍なくトリプシンがいきわたるようにゆっくり回転させる。
5. 培養容器をインキュベーターに戻し、5 分ほど置く。
6. 顕微鏡で細胞を観察し、細胞が浮遊していることを確認する。必要があれば、培養容器の側面をそっと叩き、張り付いている細胞を浮きあがらせる。
7. 5 ml の血清の入った培地で細胞を再懸濁させトリプシンを不活性化させる。懸濁液から 50  $\mu\text{l}$  ほどを取り、細胞をカウントする。
8. 新しい dish に新しい培地を入れ、細胞懸濁液を必要量入れる。全量が 5 ml になるようにする。

#### ○細胞数測定

1. 細胞培養の手順 1～7 まで行う。
2. 血球計算盤にカバーガラスを乗せ、息（蒸気）でくつつける。
3. 希釈した細胞懸濁液を、マイクロピペットを使用して 96 well dish に 50  $\mu\text{l}$  入れる。  
同じ well にトリパンブルーを 50  $\mu\text{l}$  入れ、ピペッティングする。
4. 3 の懸濁液を 50  $\mu\text{l}$  とり、血球計算盤とカバーガラスの間に入れる。この時、液を入れすぎないように、また気泡が入らないように注意する。
5. 顕微鏡（倍率100倍）で観察し、血球計算盤の四隅の区画の細胞数を数える。ただし、線上にある細胞は相対する辺いづれか一方の線上にある細胞だけを数える（例えば上側と右側の外側だけを数えて下側と左側の内側を数えない）。
6. 次のように細胞数を算出する。

$$\begin{aligned} \text{細胞数 (cell/ml)} &= (\text{測定した合計細胞数}) / (\text{測定した区画数}) \times \text{希釈倍率} \\ &\quad (\text{上記では 2 倍}) \times 10^4 \end{aligned}$$

$$\text{総細胞数 (cell)} = 1 \text{ ml 当たりの細胞数} \times \text{細胞懸濁液の容積}$$

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \text{生細胞の計測数} / \text{全細胞の計測数} \times 100$$

## ○細胞回収（ウエスタンブロッティング法）

### 【回収用試薬の調整】

4 × DB                700  $\mu$ L

滅菌水                700  $\mu$ L

#### ・ RIPA Buffer

20 mM Tris-HCl pH7.4

10 mM  $MgCl_2$

60 mM  $\beta$ -glycerophosphate

20 mM NaF

1 mM APMSF, 50  $\mu$ g/ml aprotinin, 20  $\mu$ g/ml pepstatin, 20 ng/ml leupeptin ← PI (protease Inhibitor cocktail)

1 mM DTT

1 % TritonX-100

滅菌水で fill up

### 【細胞回収】

1. 培地をインキュベーターで完全に吸う。
2. 氷上で PBS 溶液を 1 ml 入れる。(浮きやすい細胞は PBS で洗わない)
3. PBS 溶液を捨てる。
4. 2×DB または RIPA Buffer を 100  $\mu$ L ~125  $\mu$ L/1 well 入れる。
5. 10分揺らして攪拌する。
6. 液体を日付とサンプル番号を書いたエッペンチューブ (1.5 ml チューブ) に回収する。
7. しっかりとエッペンチューブの蓋を閉める。
8. 100℃で10分間加熱する。
9. -30℃で保存する。

## ○ウエスタンブロッティング法

### 【ウエスタンブロッティングのゲル作成】

1. i-wipe にゲル板の斜めになっている方を上に向けて置く。
2. アルコールを噴霧し, ゲル板の埃をとる。
3. ゴムパッキンをゲル板の上に乗せる。
4. ゲル板を重ね合わせ両端を 2 個のクリップで止める。

5. 1.5 M Tris (pH8.8), 30% アクリルアミド, 滅菌水を混合し, ランニングゲル (12.5% アクリルアミド) を調整する。  
調整したランニングゲルに APS を液量の1/100, TEMED を1/1000入れてゲル板に入れる。  
(例: ランニングゲル 10 ml の時, APS=100  $\mu$ l TEMED=10  $\mu$ l)
6. 70%エタノールをゲル版に入れた液の上からさらに入れ, 水面を平らにしてランニングゲルを固める。
7. ランニングゲルが固まったら70%エタノールを捨て, 蒸留水で洗い, キムワイプで水分を十分に拭き取る。
8. 0.5 M Tris (pH6.8), 30% アクリルアミド, 滅菌水を混合しスタッキングゲルを調整する。
9. 調整したスタッキングゲルに APS を液量の1/100, TEMED を1/1000入れてゲル板に入れる。
10. 気泡が入らないように, コームを挿す。
11. スタッキングゲルが固まったらサララップの上にキムワイプを敷き, ゲル板を乗せる。  
蒸留水でその都度湿らせ, 乾燥しないように包んで冷蔵庫に保管する。

#### 【電気泳動の方法 (SDS-PAGE)】

SDS-PAGE: 界面活性剤の働きを持つ。構造と電荷の影響を排除することができ, タンパク質は, その分子量の違いのみに基づいて分離される。

1. 泡が入らないように, バッファーを泳動装置に流し込む。
2. 空気が入らないようにゲル板を設置し, クリップで止める。
3. バッファーを注ぎ, コームを抜く。
4. シリンジを用いてウェルの洗浄をする。ウェルが崩れている場合は, シリンジで整える。
5. プロテインマーカーを 4  $\mu$ l 両端に入れる。
6. 回収したサンプルを 15~20  $\mu$ l 入れる。
7. 電流をゲル板 1 枚あたり 300 V, 20 mA, に設定して流す。サンプルがスタッキングゲルを通過したらゲル板 1 枚当たり 30 mA にして流す。

#### 【ウエスタンブロッティング】

1. 電気泳動後のゲルをヘラで取り出し, 不要な部分を取り除き, ETB に浸ける。
2. メンブレンをメタノールに30秒浸け, 数回蒸留水で洗う。
3. プラスチックケースの中で濾紙を ETB に浸す。
4. カセットの黒い面 (+電極) の上に ETB に浸したスポンジを 1 枚乗せ, その上に濾紙 1 枚を重ねる。

5. メンブレンを濾紙の上に乘せ、その上にゲルを乗せる。
6. 濾紙1枚, スポンジを1枚乗せ、カセットの白い面（－電極）で閉じる。
7. 装置にセットし、内側に ETB, 外側に蒸留水を注ぐ。
8. ゲル板1枚あたり 300 V, 50 mA で500分電流を流す。
9. 電源を切ってメンブレンを取り出し、Tween-PBS につける。
10. 不要な部分を切り取り、メンブレンの左端にボールペンで番号を書く。
11. Tween-PBS で振盪し、洗浄する。（×3）
12. プラスチックケースに 50～100 ml のブロッキング溶液（BSA/Tween-PBS）を入れ、この中でメンブレンを振盪させる（1時間～）。
13. ブロッキング溶液を捨て、Tween-PBS に換えて軽く洗い、ブロッキング溶液を除く。
14. 一次抗体を Tween-PBS 液量の1/3000入れ希釈し、メンブレンを浸ける（6時間～O.N.）。
15. Tween-PBS で5分間×3回振盪する。
16. 二次抗体（rabbit, mouse）を0.3%スキムミルク/Tween-PBS 液量の1/5000入れ希釈し、メンブレンを浸ける（1時間～）。
17. Tween-PBS で30分間洗う。（10分×3回）
18. 机にサランラップをきれいに張り、メンブレン1枚あたり、スーパーシグナルウエストピコの白ボトル 500  $\mu$ L, 黒ボトル 500  $\mu$ Lを試験管に混ぜ（1：1の割合）、ラップの上に液を垂らす。
19. 液の上に水気をとったメンブレンをピンセットで裏表つけ、5分おく。
20. つけたメンブレンをクリアファイルに挟む。

## ○トランスフェクション

### 【トランスフェクションの原理】

トランスフェクションとは、核酸（DNAやRNA）を人工的に細胞に導入することである。トランスフェクションを行うことで、特定の遺伝子を細胞に導入し、目的とするタンパク質の機能を解析することができる。

本実験では、導入効率が高いリポフェクション法を用い実験を行った。リポフェクション用試薬の構造は、陽性電荷のコアとなる部分と脂肪酸などの疎水性部分をもつのが特徴である。試薬は水溶液中で複数層からなる小胞（リボソーム）をつくり、陰性電荷をもつ核酸と混合すると複合体を形成し、全体としては正電荷を保つ。一方、細胞表面は、糖結合性のシアル酸残基などにより負に帯電している。電氣的に細胞表面に結合した複合体は貪食あるいはリボソームと細胞膜の融合により細胞内に取り込まれ、最終的に核内に移行して遺伝子を発現する仕組みとなっている。



**【トランスフェクションで使したプラスミド】**

- ・ F-vector
- ・ F-p53 WT
- ・ HA-IKK $\beta$
- ・ F-p53LLL/AAA
- ・ F-p53 (1-101)
- ・ F-p53 (102-292)
- ・ F-p53 (293-393)
- ・ F-RelA (286-551)
- ・ pCBP
- ・ pNF- $\kappa$ B Luc (ホタルルシフェラーゼ)
- ・ pRL-TK Luc (Stop & Glo)

**【トランスフェクション方法】**

1. 24 well plate に細胞を播種 ( $1.0 \times 10^5$  細胞/well) し, 約24時間培養する。〈1日目〉
2. プラスミドを準備する。〈2日目〉
3. エッペンの蓋に番号を書く。
4. プレミックス A と B を作る。  
プレミックス A は指定のプラスミドを 1.5 mL tube に入れ, 1 well あたり 50  $\mu$ l の Opti-MEM を入れる。
5. プレミックス B は, 1.5 mL tube に 1 well あたり 50  $\mu$ l の Opti-MEM と 3  $\mu$ l の PEI を入れる。(PEI は溶かしておく)。
6. プレミックス A に B を混ぜて, 遠心機 (フラッシュ) にかける。  
15分間待つ。
7. 24 well plate に 100  $\mu$ l ずつ入れる。
8. 約24時間培養する。
9. 24 well plate に目的の試薬を添加する。〈3日目〉

**○ルシフェラーゼアッセイ**

ルシフェラーゼアッセイとはレポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを作製し, おおののプラスミドを導入 (トランスフェクション) した。【F-vector・F-p53 WT・F-p53LLL/AAA・F-p53 (1-72)・F-p53 (1-101)・F-p53 (102-292)・F-p53 (293-393)・

F-RelA (286-551)・pNF- $\kappa$ B Luc (ホタル)・pRL-TK Luc (Stop & Glo)】

### ①【pNF- $\kappa$ B Luc】

pGL6プラスミドは、哺乳動物細胞におけるホタル酵素 (firefly luciferase) レポーター遺伝子検査のための新しい1つである代質粒。この報告は、Promega のpGL3シリーズよりも包括的な改善を行い、一方で、ルシフェラーゼのコードを改善し、哺乳動物細胞でより良い発現を確保し、プラスミド全体で予測可能なすべての転写因子結合部位に対して適切な変異処理を行い、元の機能を維持しながら、プラスミド上の様々な転写因子の非特異的結合を最小限に抑えた<sup>16,17)</sup> (図A)。

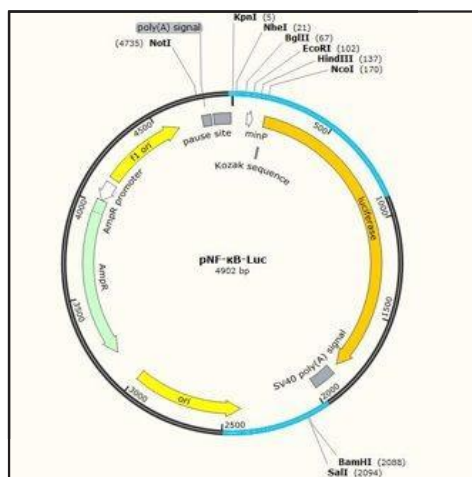


図 A pNF- $\kappa$ B Luc

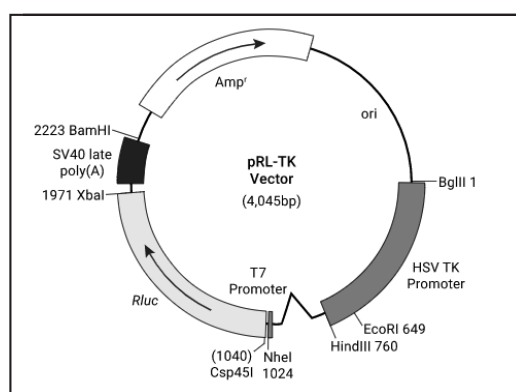


図 B pRL-TK Luc (Stop&Glo)

### 【pRL-TK Luc (Stop & Glo)】

pRL vector は野生型のウミシイタケルシフェラーゼ (Renilla RLuc) のコントロールレポーターベクターである。これらのウミシイタケルシフェラーゼを恒常的に発現するベクターはホタルルシフェラーゼベクターとともに哺乳動物細胞にトランスフェクションして使用する。ウミシイタケの発現は内部標準値として実験用のホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現を補正することができる。pVector には腔腸動物の花虫綱に属する Renilla reniformis (和名：ウミシイタケ) からクローニングされたウミシイタケルシフェラーゼ (Renilla RLuc) をコードする cDNA が含まれる。HSV-チミジンキナーゼプロモーター (pRL-TK) は比較的弱く、特に中程度の恒常的発現を必要とする場合に有用である。初期 SV40エンハンサー／プロモーター

領域 (pRL-SV40) および CMV 前初期エンハンサー／プロモーター領域 (pRL-CMV) は通常、高レベルの転写が起こるため頑健な調節エレメントを持つ実験ベクターと併用には適さない。すべての pRL Vector は dam-/dcm- の大腸菌株から精製しており、dam および dcm メチル化に感受性を持つ制限酵素でも消化することができる<sup>10)</sup> (図 B)。

## ②【ホタル由来とウミシイタケ由来のルシフェラーゼ】

ホタル (*Firefly*) とウミシイタケ (*Renilla*) 由来のルシフェラーゼは、簡便で迅速、高感度なアッセイが可能であるため広く使用されている。これらは、進化的起源が異なり、酵素の構造と基質が大きく違うことから、デュアルアッセイを行うことができる。

ホタル (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼ (図 C) は、プロモーター活性や転写後調節の両方をモニターするために最適なレポーターで、61kDa (単量体酵素) の細胞質酵素である。発光強度は、ルシフェラーゼ量に比例し、Chemi Doc を用いて測定する。

ウミシイタケ (*Renilla reniformis*) ルシフェラーゼ (図 D) は、翻訳後修飾を必要としない 36kDa の単量体タンパク質である。したがって、リアルタイムでの転写レポーターとして有用である。ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの構造と基質の違いを利用し、2種類のルシフェラーゼ活性を連続的に測定することができ、ウミシイタケルシフェラーゼをコントロールレポーターとして利用できる。アッセイでは、単一サンプル中のホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性を順番に測定する。第一の試薬を加えるとホタルルシフェラーゼが発光し、第二の試薬によってホタルルシフェラーゼが消光すると同時にウミシイタケルシフェラーゼの発光が生じる (図 C, D)。

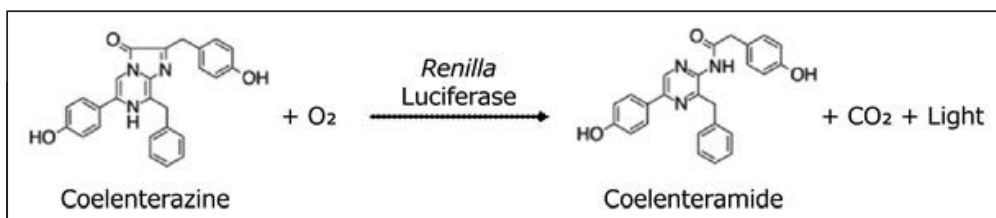


図 C ホタルルシフェラーゼの触媒反応

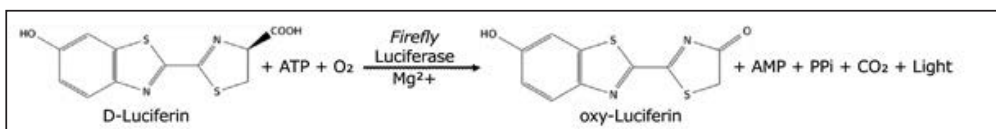


図 D ウミシイタケルシフェラーゼの触媒反応

**【ルシフェラーゼ関連試薬の調整方法】**

- ・細胞可溶化液 1×PLB の作成 (5 ml) (用事調整)

5×PLB 1000  $\mu$ l (1 ml)

H<sub>2</sub>O 4000  $\mu$ l (4 ml)

- ・1×Stop & Glo の作成 (用事調整)

Stop & Glo Buffer 1,600  $\mu$ l

Glo 32  $\mu$ l

**【ルシフェラーゼアッセイの細胞回収の方法】**

1. DMEM 培地をアスピレーターで完全に吸う。
2. 刺激済みの 24 well ディッシュに 1×PBS を 500  $\mu$ l ゆっくり入れる (洗いの工程)。
3. 1×PBS を捨ててアスピレーターで吸う (できるだけ完全に吸うこと)。
4. 細胞可溶化液 1×PLB 100  $\mu$ l/1 well を入れる。
5. 10分間 -80℃で凍らせ, その後室温で溶かす。
6. 細胞抽出液を 1.5 ml tube に回収。
7. 5分間 遠心 15000 rpm。
8. ルシフェラーゼ解析用のサンプル完成 (細胞可溶化液)。
9. 96 well ディッシュにサンプルの上清を 15  $\mu$ l ずつ入れる。(沈殿は吸わない)
10. ホタルルシフェラーゼ (LAR II) を 96 well plate に 60  $\mu$ l ずつ入れる。
11. 軽く横に振り Chemi Doc で測定。
12. 続いて, 同じプレートに 1×Stop & Glo を 60  $\mu$ l をずつ入れ, 測定を行う。

GP2-293細胞を $1.0 \times 10^5$  細胞/well の密度で 24 well collagen coat プレートに播種し, 24時間培養後, PEI を用いて NF- $\kappa$ B 結合配列をもつルシフェラーゼレポータープラスミド (pNF- $\kappa$ B Luc), pRL-TK を用いてトランスフェクションを行った。24時間後, 50 ng/ml の TNF $\alpha$  刺激24時間後, 細胞を回収し, 細胞可溶化液 (タンパク質抽出液) を調整した。可溶タンパク質 15  $\mu$ l を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

TNF $\alpha$  の刺激によって, 活性化した NF- $\kappa$ B がプラスミドの NF- $\kappa$ B 結合配列に結合することで転写・翻訳が行われ, 酵素であるルシフェラーゼが合成される。合成すると発光し, 発光量を測定することで NF- $\kappa$ B の活性度合いを確認できる。NF- $\kappa$ B の活性が多いほど, ルシフェラーゼの合成量が多くなり, 発光量が増加していく。

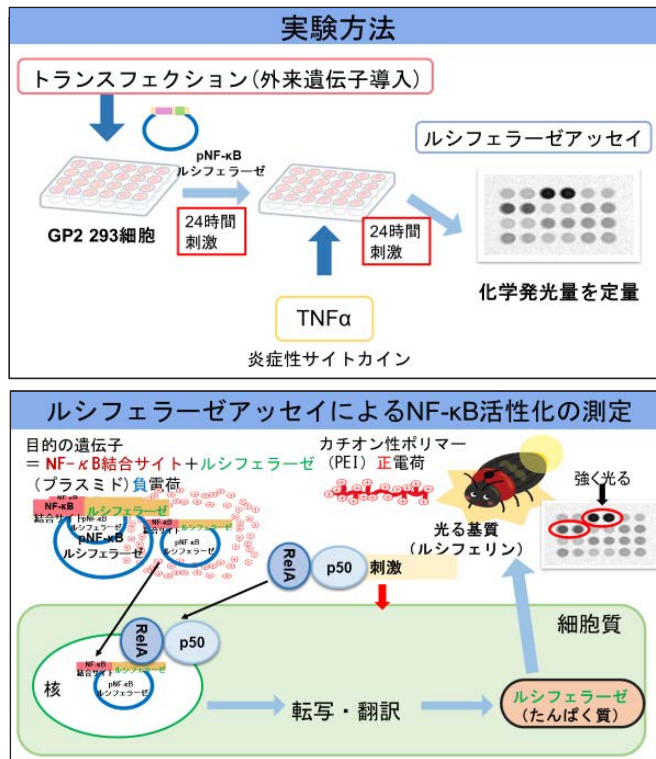


図 E ルシフェラーゼ解析の流れ

### ○ルシフェラーゼ，ウエスタンブロッティングのデータの解析方法

- ・ 使用した機器：Chemi Doc
- ・ ソフトウェア：Image Lab 4.0

#### 【Chemi Doc, Image Lab 4.0の操作方法】

1. Image Lab 4.0をダウンロードしてインストールする。
2. Chemi Doc の電源をつけ，No filter に設定する。
3. plotcols の New をクリックする。
4. Application の Select → Blots → Chemi を選択する。
5. set up から First image time1, Last image time300, Total number of images100に設定する。
6. (反応に時間がかかる場合は Last image time を100～600に設定する)
7. Position Gelを押す。
8. Run protocol で解析開始。

9. 画像を右クリックし save All でファイルに保存する。
10. 過剰（赤色）になるすぐ前の画像を選ぶ。
11. Volume Tools → Round を押し、24個の丸に合わせる。
12. Analysis Table を押し USB に保存する。

### ○ルシフェラーゼ，ウエスタンブロットティングのデータのグラフ作成

#### 【エクセル解析方法】

1. 先程保存した Stop & Glo と Luc のデータを開く。
2. NF- $\kappa$ B の Volume (int) のデータを使用する。
3. Stop & Glo の Volume (int) のデータを Luc のデータに貼り付ける。
4. Luc の Volume (int)  $\div$  Stop & Glo の Volume (int) = 生データ
5. 生データのコントロールを 1 とし、それぞれの相対値を求める。
6. 平均を求める。
7. 平均のデータから棒グラフを作成する。
8. 標準偏差を求める。
9. T 検定（両側検定）で有意差を求める。

## 目 的

NF- $\kappa$ B はサイトカインなどの発現を制御する重要な転写因子であり、その活性はリン酸化酵素である、I $\kappa$ B キナーゼ  $\beta$  (IKK $\beta$ ) により制御されている。腫瘍壊死因子 (TNF $\alpha$ ) 等の炎症性サイトカインが TNF $\alpha$  受容体に結合すると、IKK $\beta$  の活性化が誘導され、最終的に活性化された、NF- $\kappa$ B は様々な遺伝子発現を誘導する。それと同時に、活性化された NF- $\kappa$ B は Inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) や A20 (脱ユビキチン化酵素) 等の NF- $\kappa$ B 阻害タンパク質の発現を誘導し、ネガティブフィードバック制御により NF- $\kappa$ B を負に制御していることが明らかとなっている。がん抑制タンパク質 (p53) は通常ではユビキチンリガーゼ (Mdm2) により分解され、タンパク質量が少なくなっている。しかし、DNA 損傷や紫外線、放射線などの遺伝毒性ストレスに応答し、p53が活性化される。活性化した p53は傷害された細胞の細胞周期の停止、アポトーシスを誘導し、発がんを抑制すると考えられている。先行研究の結果から RelA-TAD (転写活性化ドメイン) と Hsp70が IKK $\beta$ の活性化を抑制していることが示唆された。また RelA-TAD には LxxLL モチーフが保存されており、このモチーフは RelA 以外の他の転写因子 p53にも保存されている共通のモチーフであることが示唆された。転写因子の多くが TAD 領域を持ち、p53にも存在す



る。p53は転写の段階において NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することが報告されているが、詳細な作用機序は明らかとなっていない。これまでに RelA と p53が CBP を取り合うことにより活性化を互いに抑制していることが報告されているが、NF- $\kappa$ B の具体的な抑制機構は解明されていない。本研究では、p53-TAD による NF- $\kappa$ B 制御機構を明らかにするため、IKK $\beta$  の活性制御機構に着目し、解析を行った。

## 結 果

### F-p53 WT による NF- $\kappa$ B の転写活性の変化

トランスフェクション法を用いて IKK $\beta$  と転写因子 p53を細胞内へ直接導入し、ルシフェラーゼアッセイ法で F-vector と F-p53の NF- $\kappa$ B の転写活性について比較した。F-vector は p53を持たない空のプラスミドでありタンパク質は発現しない。F-p53 WTは、転写因子 p53の全長 (1-393) プラスミドである。

GP2-293細胞を $1.0 \times 10^5$  細胞/well の密度で 24 well collagen coat プレートに播種し、24時間培養後、PEI を用いて NF- $\kappa$ B 結合配列をもつルシフェラーゼレポータープラスミド (pNF- $\kappa$ B Luc), pRL-TKを用いてトランスフェクションを行った。24時間後、50 ng/ml の TNF $\alpha$  刺激24時間後、細胞を回収し、細胞可溶化液 (タンパク質抽出液) を調整した。可溶タンパク質 15  $\mu$ l を用いてルシフェラーゼアッセイを行った (図11)。

F-vector においては NF- $\kappa$ B の活性化が誘導されるのに対して、p53 WT を過剰発現させると TNF $\alpha$  による NF- $\kappa$ B の活性化が有意に抑制されることが確認された。結果として、p53 WT は F-vector と比較して NF- $\kappa$ B の活性化が低く、有意な差 ( $p < 0.01$ ) があった。

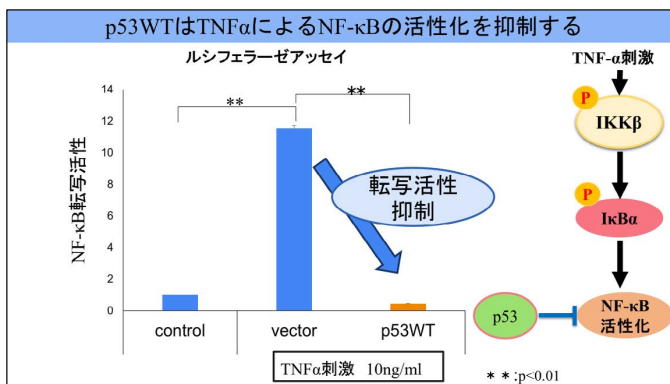


図11 F-vector と F-p53WT の NF- $\kappa$ B 活性化の比較結果

### p53 (1-101) TAD, p53 (102-292) RHD, p53 (293-393) TD, BD の比較

TAD 領域は立体構造を持たない天然変性領域であり, 細胞内情報伝達のアプタンパク質としての機能に着目した。p53 (1-101) TAD 領域が NF- $\kappa$ B の活性化を抑制するか, F-vector と p53 のそれぞれの領域で比較した。p53 を TAD 領域の1-101, DNA 結合領域の102-292, 四量体形成領域 (TD) と塩基性領域 (BD) の293-393の3つに分解し, NF- $\kappa$ B の活性化が抑制されるかどうか解析を行った (図12)。

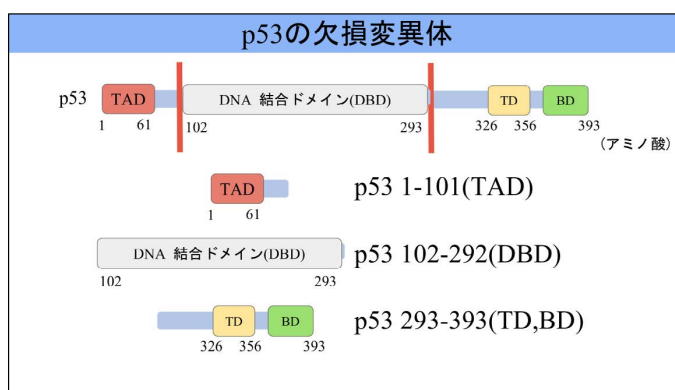


図12 p53の欠損変異体

GP2-293細胞を $1.0 \times 10^5$  細胞/well の密度で 24 well collagen coat プレートに播種し, 24時間培養後, PEI を用いて  $3 \times$  NF- $\kappa$ B 結合配列をもつルシフェラーゼレポータープラスミドのトランスフェクションを行った。24時間後, 細胞を回収し, 細胞可溶化液 (タンパク質抽出液) を調整した。可溶タンパク質  $15 \mu\text{l}$  を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

結果として, p53 (1-101) TAD を発現させると F-vector と比較して, NF- $\kappa$ B の活性が低く, 有意な差が確認された。( $p < 0.001$ )

p53 (102-292) や p53 (293-393) は F-vector と比較して, NF- $\kappa$ B の転写活性に有意な差は見られなかった。このことから, p53 (1-101) TAD 領域で NF- $\kappa$ B の活性化が抑制されることが示唆された (図13)。

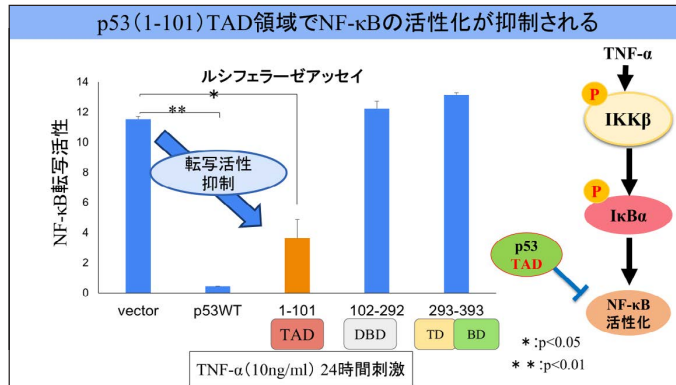


図13 p53 (1-101) TAD 領域で NF- $\kappa$ B の活性化が抑制される

### F-p53 (LLL/AAA) と F-p53 WT の比較

LxxLL モチーフが p53 でも NF- $\kappa$ B の活性化の抑制に関与するかを p53 の TAD 領域に存在する特殊なアミノ酸配列の Leu 22, Leu 25, Leu 26 すべてアラニン (A) に置換した p53 (LLL/AAA) (TAD 点変異体) を用いて解析を行った (図14)。

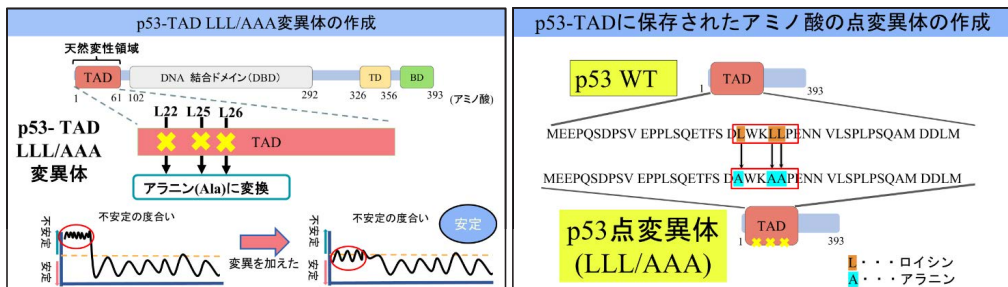


図14 p53-TAD (LLL/AAA) 変異体の作成

GP2-293細胞を  $1.0 \times 10^5$  細胞/well の密度で 24 well collagen coat プレートに播種し、24時間培養後、PEI を用いて NF- $\kappa$ B 結合配列をもつルシフェラーゼレポータープラスミドのトランスフェクションを行った。24時間後、細胞を回収し、細胞可溶化液 (タンパク質抽出液) を調整した。可溶タンパク質  $15 \mu\text{l}$  を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

結果として、p53点変異体では NF- $\kappa$ B の活性が p53 WT と比較しわずかに回復するものの、F-vector と比較すると低く、有意な差 ( $p < 0.01$ ) があった (図15)。今回の 3 箇所の点変異では TAD の IDP が維持されていた可能性があり、追加で変異箇所を増やすことで、TAD の IDP

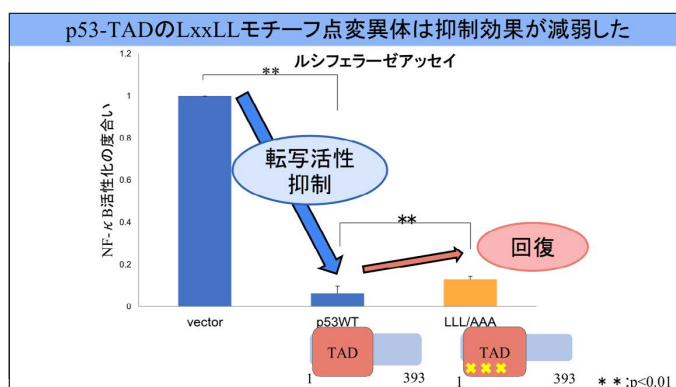


図15 p53-TAD (LLL/AAA) 変異体の抑制効果の変化

の関与について解析を行う。また、p53 WTにおける点変異体を用いて解析を行なったため、転写の影響を排除できていない可能性があるため、p53-TADにおける点変異体を作成し、NF-κBの活性への影響について解析を行う必要がある。

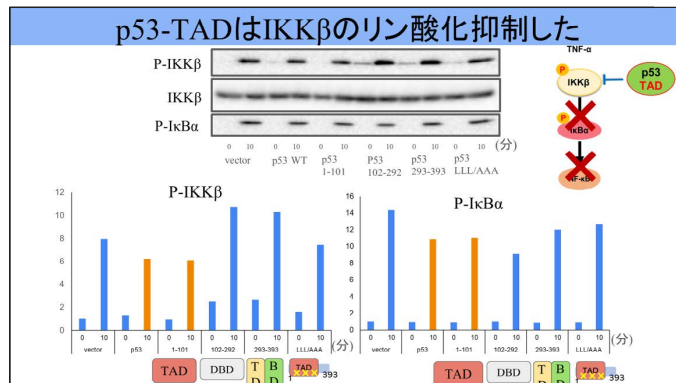
### p53 WT, p53 (1-101) TAD による内在性 P-IKKβ, P-IκBα の変化

NF-κB 経路に関わるタンパク質の IKKβ は NF-κB の活性化を制御する上流のタンパク質である。IKKβ がリン酸化されると、P-IKKβ は IκBα をリン酸化し、ユビキチン・プロテアソーム経路を介して IκBα の分解が誘導される。続いて、IκBα によりマスキングされていた RelA の核移行ドメインが露出し、NF-κB は核内に移行し、NF-κB 標的遺伝子の発現を促進する。本実験では、p53 WT, p53 (1-101) TAD が NF-κB 経路の上流因子である IKKβ と IκBα に対して、活性化の抑制効果があるのかを解析を行なった。

GP2-293細胞を  $3.0 \times 10^5$  細胞/well の密度で 6 well collagen coat プレートに 2 プレート播き、24時間培養後、PEI を用いてプラスミド (F-vector, p53 WT は各 0.4 μg, p53 (1-101) TAD は 0.8 μg) をトランスフェクションした。24時間後、TNFα (50 ng/ml) 刺激を 0 分, 5 分, 10 分行い、細胞を回収した。サンプルは 20 μL/well で、SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、リン酸化 IKKβ 抗体 (P-IKKβ (ser176/ser180)), IKKβ 抗体, P-IκBα 抗体, IκBα 抗体, action を用いてウエスタンブロッティング法により目的のタンパク質を検出した (図16)。

#### ・P-IKKβ の変化について

TNFα 刺激10分で、P-IKKβ の活性を比較すると、p53 WT, p53-TAD を過剰発現させると P-IKKβ の活性化が抑制されることが判明した。

図16 TNF $\alpha$  刺激により誘導される P-IKK $\beta$ , P-I $\kappa$ B $\alpha$  の変化

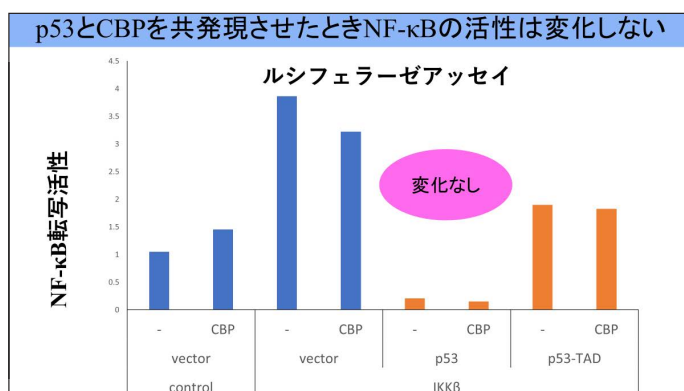
#### ・ I $\kappa$ B $\alpha$ の変化について

活性型の P-IKK $\beta$  により I $\kappa$ B $\alpha$  がリン酸化される (I $\kappa$ B $\alpha$ ) と, I $\kappa$ B $\alpha$  は分解され, NF- $\kappa$ B の活性化誘導される。TNF $\alpha$  刺激後 5 分で比較すると, p53-TAD は I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化を顕著に抑制することが判明した。

#### CBP を介した p53 による NF- $\kappa$ B 抑制の否定

先行研究では, 核内で p53 と NF- $\kappa$ B が CBP の奪い合いにより, 互いを抑制し合っていると報告されている。そこで, 細胞内に CBP と p53 をトランスフェクションにより過剰発現させ, NF- $\kappa$ B の活性化の変化をルシフェラーゼアッセイで解析を行なった。

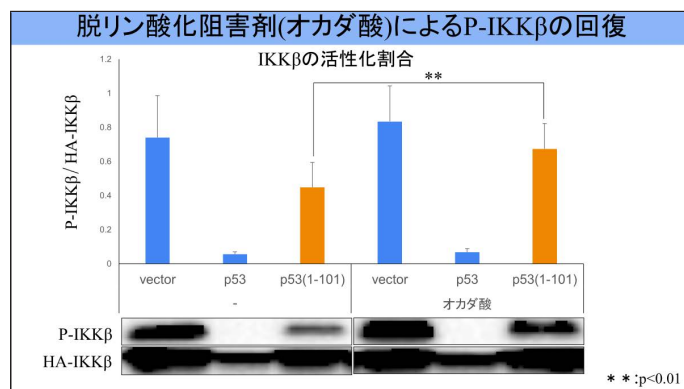
GP2-293細胞を  $1.0 \times 10^5$  細胞/well の密度で 24 well collagen coat プレートに播種し, 24時間培養後, PEI を用いて NF- $\kappa$ B 結合配列をもつルシフェラーゼレポータープラスミド (pNF- $\kappa$ B Luc), pRL-TK, 各  $0.1 \mu\text{g}$  を  $1.5 \text{ ml}$  tube に入れた。pCBP  $0.1 \mu\text{g}$ , F-p53 WT  $0.05 \mu\text{g}$ , F-p53-TAD  $0.1 \mu\text{g}$  を pNF- $\kappa$ B Luc と pRL-TK, HA-IKK $\beta$  が入った  $1.5 \text{ ml}$  tube それぞれに入れてトランスフェクションを行った。24時間後, 細胞を回収し, 細胞可溶化液 (タンパク質抽出液) を調整した。可溶タンパク質  $15 \mu\text{l}$  を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。結果は CBP と p53 を共発現させた条件と, p53 のみを発現させた条件において NF- $\kappa$ B の活性度合いに差はみられなかった。p53 と CBP を共発現させたが NF- $\kappa$ B の活性は変化がなかった (図17)。

図17 CBP を介した p53による NF- $\kappa$ B 抑制効果の変化

### 脱リン酸化阻害剤であるオカダ酸による p53発現時の NF- $\kappa$ B の活性度合いの変化

核内での経路は関与していないことが示唆されたことから、細胞質における制御に着目し、NF- $\kappa$ B 活性化経路の上流である IKK $\beta$  の脱リン酸化酵素の関与について解析を行なった。そこで、脱リン酸化阻害剤であるオカダ酸を添加して、PP2A の関与について解析を行なった。GP2-293細胞を $1.0 \times 10^5$  細胞/well の密度で 24 well collagen coat プレートに播種し、24時間培養後、PEI を用いて各々のプラスミド入れてトランスフェクションを行なった。24時間後、オカダ酸を  $1 \mu\text{l/well}$  ( $10 \mu\text{M}$ ) 添加し 1 時間後、細胞を回収した。リン酸化 IKK $\beta$  抗体 (P-IKK $\beta$  (ser176/ser180)), IKK $\beta$  抗体を用いてウエスタンブロッティング法により目的のタンパク質を検出した (図18)。

特に p53-TAD の阻害効果をオカダ酸は抑制することが明らかとなった。このことから、p53-

図18 オカダ酸による P-IKK $\beta$  の変化



TAD は IKK $\beta$  の脱リン酸化が阻害され、NF- $\kappa$ B 活性が抑制されることが示唆された。

結果はオカダ酸を添加することにより、p53-TAD による NF- $\kappa$ B 阻害効果の減弱が見られた。(有意差  $p < 0.01$ ) このことから、p53-TAD が脱リン酸化酵素と協調して P-IKK $\beta$  を負に抑制する可能性が示唆された。

## 考 察

NF- $\kappa$ B シグナルと p53 シグナルは互いに抑制しあう関係にあり、NF- $\kappa$ B の RelA と p53 が核内でヒストンアセチル化酵素 (CBP) を取り合うことにより、互いに転写活性が制御されていることが報告されている。しかし、p53 による NF- $\kappa$ B の詳細な制御機構は解明されていない。本実験では、相反する作用を持つ NF- $\kappa$ B (RelA) と p53 に着目し、p53 の TAD の機能について解析を行った。

NF- $\kappa$ B の活性抑制に関与する p53 のタンパク質構造領域を探るために、p53 の全長を p53 (1-101) 欠損変異体 (p53-TAD)、p53 (102-292) 欠損変異体、p53 (292-393) 欠損変異体に分けて解析を行った。p53 (102-292) 欠損変異体、p53 (292-393) 欠損変異体では、NF- $\kappa$ B の活性化が抑制されないのに対して、p53-TAD は NF- $\kappa$ B の活性化を顕著に抑制することが判明した。このことから、p53-TAD は NF- $\kappa$ B 活性化を抑制する働きを持つことが示唆された。

実験のまとめ	
プラスミドの種類	NF- $\kappa$ B の活性化抑制
F-vector	✕
F-p53WT	○
F-p53 1-101(TAD)=天然変性領域	○
F-p53 102-292(DBD)	△
F-p53 292-393(TD,BD)	△
F-p53 (LLL/AAA)	△

図19 実験結果のまとめ

先行研究において RelA-TAD に存在する LxxLL モチーフが IKK $\beta$  のリン酸化を抑制し、NF- $\kappa$ B を抑制することが示唆されている。p53-TAD の領域においても LxxLL モチーフが保存されており、実際に p53-TAD の点変異体では、NF- $\kappa$ B の活性抑制の減弱がわずかに確認された。p53-TAD も RelA-TAD と同様に LxxLL モチーフを介して IKK $\beta$  のリン酸化を直接抑制することによって、NF- $\kappa$ B の活性を負に制御すると考えられる (図19)。

ヒストンアセチル化酵素である CBP は NF- $\kappa$ B や p53 に結合することで、がん細胞の増殖または炎症作用が促進されると考えられている。先行研究 p53 と RelA は CBP を取り合うことにより転写が阻害され、NF- $\kappa$ B の抑制がされていることが報告されている<sup>11,18)</sup>。そこで、CBP を細胞内に過剰に発現させた状態における p53 による NF- $\kappa$ B 活性抑制の変化について解析を行った。CBP の過剰発現系の実験では差がみられなかったが、CBP が核内に局在しているのか、NF- $\kappa$ B と CBP の結合に変化がみられるのか確認する必要がある。

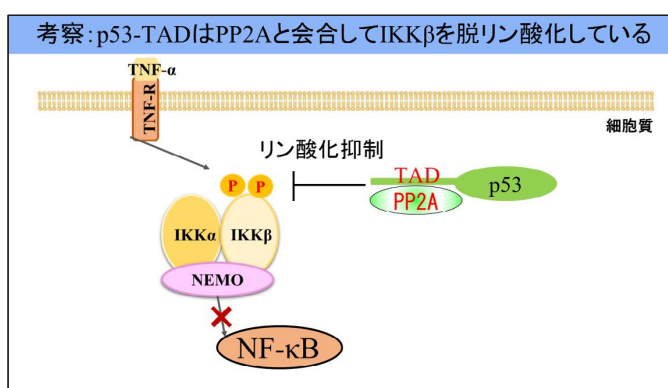


図20 p53-TAD と PP2A が結合し IKK $\beta$  を脱リン酸化する

今後の検討として、炎症性サイトカイン刺激を TNF $\alpha$  だけではなく、IL-1, IL-6, LPS 処理を行い、NF- $\kappa$ B 活性をルシフェラーゼアッセイ法やウエスタンブロッティング法で確認することが必要である。本実験において、IL-1, IL-6, LPS の添加実験を行ったが、NF- $\kappa$ B 活性の活性化が誘導されなかったため、培養細胞株を変更し、再度検討を行う必要がある。

さらに、IKK $\beta$  のリン酸化抑制の分子機序を明らかにするために、p53 がどの段階で IKK $\beta$  の抑制をかけているのかを検討する。先行研究では、RelA-TAD に PP2A と Hsp70 が結合し、IKK $\beta$  のリン酸化抑制に関与していることが明らかとなっている。Hsp70 は、熱などのストレスに応じて発現が誘導される約 70kDa のタンパク質である。ストレスタンパク質には、一般的に他のタンパク質をストレスによる変性から守り、新しく合成されるタンパク質の折りたたみを助ける機能がある<sup>18,19,20,21,22,23)</sup>。

そこで、p53-TAD の結合実験として、免疫沈降法で p53-TAD と IKK $\beta$  の結合、p53-TAD と PP2A の結合、p53-TAD と Hsp70 の結合について免疫沈降法を用いて解析を行う (図20, 21)。さらに、IKK $\beta$  と p53 細胞内局在変化を蛍光顕微鏡で観察し、細胞内で共局在するのか研究を行い、細胞質と核に注目し、時空間的な局在変化がみられるのか確認を行う。最終的に p53-TAD による NF- $\kappa$ B の活性抑制機能について明らかにすることで、新たな抗炎症療法や抗がん療法の開発に繋げていきたい。

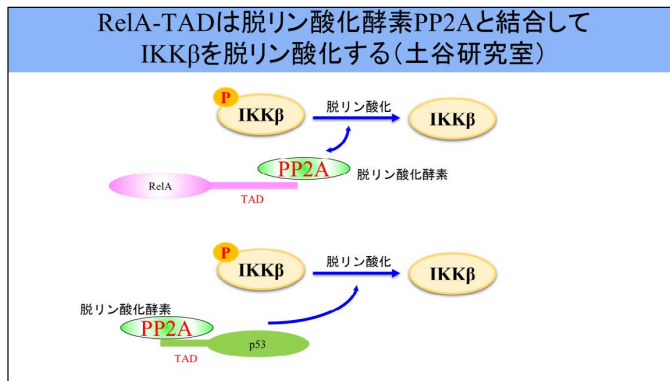


図21 p53-TAD と PP2A が結合し IKK $\beta$  を脱リン酸化する可能性

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、数えきれないほどのさまざまなご助言や励ましを下さり、ご指導いただきました、野間隆文教授、妻木陽子教授に心より深く感謝申し上げます。

## 略 語

- ・ APS Ammonium Peroxodisulfat (ペルオキソニ硫酸アンモニウム)
- ・ DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium (ダルベッコ変法イーグル培地)
- ・ ETB Embedded Trace Buffer (転写バッファー)
- ・ FBS Fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
- ・ I $\kappa$ B $\alpha$  Inhibitor of NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B 阻害タンパク質)
- ・ IKK Inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase (I $\kappa$ B キナーゼ)
- ・ LAR II Firefly Luciferase (ホタルルシフェラーゼ)
- ・ Mdm2 Murine Double Minute 2
- ・ NF- $\kappa$ B nuclear factor- $\kappa$ B (核内因子  $\kappa$ B)
- ・ PBS Phosphate Buffered Salts (リン酸緩衝生理食塩水)
- ・ PLB Passive Lysis 5 Buffer
- ・ PRL-TK Renilla Luciferase Control Reporter Vectors
- ・ Stop & Glo Renilla Luciferase (ウミシイタケルシフェラーゼ)
- ・ TAD Trans Activation Domain

- ・ TEMED            Tetramethylethylenediamine (テトラメチルエチレンジアミン)
- ・ TNF $\alpha$             Tumor necrosis factor- $\alpha$  (腫瘍壊死因子  $\alpha$ )
- ・ RelA              v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A

## 参 考 文 献

- 1) Shared principles in NF-kappaB signaling. Hayden, M. S. & Ghosh, S.: Shared principles in NF-kB signaling. *Cell*, 132, 344–362, (2008)
- 2) NF-kB signaling in inflammation. Perkins, N. D.: Integrating cell-signaling pathways with NF-kB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 49–62, (2007)
- 3) NF-kB の活性化とシグナル伝達 | アプカム (abcam.co.jp) Moynagh PN. The NF-kB pathway. *J Cell Sci.* 118, 4389–4392, (2005)
- 4) Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. Bassères DS, Baldwin AS. *Oncogene*. Oct 30; 25(51): 6817–6830, (2006)
- 5) NF-kB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. Abbott DW, Yang Y, Hutti JE, Madhavarapu S, Kelliher MA, Cantley LC, *GENES & DEVELOPMENT* 26: 203–234, (2012)
- 6) The I $\kappa$ B Kinase Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , Necessary for I $\kappa$ B Phosphorylation and NF-kB Activation: Cell. Matthew S Hayden-, Sankar Ghosh, *Genes Dev.* 1; 26(3): 203–234, (2012)
- 7) 新学術領域研究「修飾シグナル病」中高校生・専門外の皆さんへの研究成果報告～細胞の営みと病気との関係を明らかにしようとした研究グループの5年間～(umin.jp). 井上純一郎
- 8) Distinct B subunits of PP2A regulate the NF-kB signalling pathway through dephosphorylation of IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$  and RelA. Yoshihiro Tsuchiya, *FEBS Letters*, 591, (2017)
- 9) がんの細胞生物学. Robert G. McKinnell, Ralph E. Parchment, Alan O. Perantoni, G. Barry Pierce, 株式会社 医学書院, p35, (2000)
- 10) がん抑制タンパク質 p53 の四量体形成. 鎌田瑠泉, 坂口和靖, *生化学 第82巻 第6号*, 484–493, (2010)
- 11) p53加齢・老化を含めて. 長谷川洋, 南野徹, *千葉大学大学院循環病態医科学*, Vol. 43 No. 5, (2011)
- 12) 転写因子 p53 の翻訳後修飾と転写活性化機構. 田中知明, *生化学 第82巻 第3号*, 200–209, (2010)
- 13) 転写因子 NF-kB の新しい活性化機構. 櫻井宏明, *化学と生物 Vol. 42 No. 1*, (2004)
- 14) Intrinsically Disordered Proteins and Intrinsically Disordered Protein Regions. Christopher J Oldfield 1, A Keith Dunker, *Annu. Rev. Biochem.* 83. 1. (2014)
- 15) 天然変性タンパク質をターゲットとした新しい構造生物学 PF 研究会 (2011)
- 16) 遺伝子発現調節を基礎からわかりやすく解説【真核生物】(sciencedocter.com)
- 17) Improved response ratio for NF-kB inhibition analysis using new luciferase reporter vector (pGL4.32 [luc2P/NF-kB-RE/Hygro]). Gould, S. J. and Subramani, S. *Anal. Biochem.* 175, 5–13, (1988)
- 18) Chronic inflammation and cancer: potential chemoprevention through nuclear factor kappa B and p53 mutual antagonism. Srabani Pal1, Ashish Bhattacharjee, Asif Ali, Narayan Mandal, SubhashCMandall and Mahadeb Pal, *Journal of Inflammation*, Article number: 23 (2014)
- 19) 天然変性タンパク質をターゲットとした新しい構造生物学 PF 研究会 (2011)
- 20) Crucial HSP70 co-chaperone complex unlocks metazoan protein disaggregation. Nadinath B. Nillegoda, Janine Kirstein, Anna Szlachcic, Mykhaylo Berynsky, Antonia Stank, Florian Stengel, Kristin Arnsburg, Xuechao Gao, Annika Scior, Ruedi Aebersold, D. Lys Guilbride, Rebecca C. Wade, Richard I. Morimoto,

- Matthias P. Mayer & Bernd Bukau, *Nature* volume 524, pages247–251, (2015)
- 21) Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. Hipp, M. S., Park, S. H. & Hartl, F. U. *Trends Cell Biol.* 24, 506–514, (2014)
  - 22) Targeting Cell Survival Factors, HSF1 and HSPs, with a Specific Inhibitor for Cancer Therapy. KENZO OHTSUKA, *Thermal Med*, 33(1): 1–18, (2017)
  - 23) Chaperoning extended life. Marc Tatar, Aziz A. Khazaeli & James W. Curtsinger, *Nature* 390, 30, (1997)