

学位授与番号	医博甲第1347号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
氏名	李英珠		
学位論文題目	ATMタンパク質とP53との相互作用の解析		
論文審査委員	主査	教授	山本健一
	副査	教授	村上清史
		教授	山本博

内容の要旨及び審査の結果の要旨

毛細血管拡張性小脳失調症 (ataxia-telangiectasia, AT) は進行性小脳失調, 毛細血管拡張, 免疫不全, 高発ガン性などを特徴とする常染色体劣性遺伝病であり, その患者の細胞は電離放射線高感受性, 染色体不安定性, アポトーシスやチェックポイント機構の異常などきわめて多彩な形質を示す。その病因遺伝子, ATM (AT-mutated) が1995年にポジショナルクローニングによってクローニングされ, ホスファチジルイノシトール-3キナーゼファミリーメンバーとして細胞周期のチェックポイントやDNA損傷に対する応答などに重要な役割をしていると考えられている。正常細胞では, 電離放射線により腫瘍抑制タンパク質P53の蓄積が生じ, その作用によって細胞周期がG1期で停止する。しかしAT患者由来の細胞では, 電離放射線照射後P53の蓄積が生じず, G1期停止が起こらない。このことから, DNA損傷によってP53が安定化, 蓄積する機構にATMの関与が示唆されているが, いまだ不明な点が多い。

本研究では, ヒトATMの全長及び2種類のN末端欠失型のcDNAをN末端にHA標識を付けた形でクローニングベクター (pBluscript II KS) に組み込み, さらに発現ベクター (pEF-BOS) に組み込んでATM発現ベクターを作成した。ATMタンパク質の発現をウエスタンブロット法で確認した後, ATMタンパク質とP53の結合については免疫沈澱後ウエスタンブロット法によって解析した。更に, 試験管内タンパク質合成系でいくつかの欠失型ATMタンパク質を合成し, GST (Glutathione-S-transferase) - P53融合タンパク質との結合試験を用いて, ATMタンパク質とP53の結合領域を同定した。

その結果, N末端HA標識を付けた全長及び2種類のN末端欠失型ATMのcDNAを組み込んだ発現ベクターをアフリカミドリザル腎臓上皮由来COS-7細胞株に導入し, HAまたはATM抗体を用いて, ウエスタンブロット法により予想された大きさのATMタンパク質が発現することを認めた。続いて, このATMタンパク質発現細胞系を用いて, 細胞抽出系をP53抗体を用いて免疫沈澱し, この免疫沈澱したタンパク質をHA抗体を用いてウエスタンブロット法で解析した。また逆に, HA抗体を用いて免疫沈澱し, P53の抗体を用いて, ウエスタンブロット法で解析した。その結果, 細胞内でのATMタンパク質とP53との結合を認めた。さらに, その結合のDNA依存性について調べるため, 同じATMタンパク質発現細胞系を用いて, DNase A処理したものとししない細胞抽出物で免疫沈澱後ウエスタンブロット法により比較検討をした結果, 両者に差はなかった。さらに詳しくATMのP53結合領域を解析するため, 試験管内で各種欠失型ATMタンパク質を合成し, GST-p53 (1~393アミノ酸) 融合タンパク質と反応させ, 結合性を調べた。またATMがP53のどの領域と結合するのかをP53のN末端の転写活性化ドメイン (1~101アミノ酸), 中央のDNA結合ドメイン (102~292アミノ酸), そしてC末端の四量体形成ドメイン (293~393アミノ酸) をそれぞれ発現するGST-融合タンパク質を作り, ATMタンパク質との結合実験を行い, 結合領域を解析をした。その結果ATMのC末端2139番目のアミノ酸から2426番目のアミノ酸までの領域がP53の配列特異的DNA結合に関与する領域との結合性に関与することが初めて示された。

以上の結果より, ATMタンパク質はP53と直接結合することが示された。このATMタンパク質とP53との相互作用は, DNA損傷ストレス応答におけるATMによるP53の活性化に重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究は, 小脳失調, 免疫不全及び高発がんを特徴とする遺伝性疾患の原因遺伝子産物の役割解析により, 本疾患の分子病態の解明に貢献する研究と評価された。