

研究助成 2019 – がん領域 –
研究成果報告書（最終） <概要>

所 属	金沢大学ナノ生命科学研究所
氏 名	中山隆宏
研 究 テーマ	がん抑制因子 p53 の凝集の立体構造動態と機能の解明

- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 概要の構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果などを、1 ページにまとめること。
 （図表、写真などの貼付を含む）

がんの症例の半分を占めるがん抑制因子 p53 の変異が細胞のがん化を誘導するメカニズムの一つとして、p53 がアミロイド凝集して、プリオン様伝播する説が提唱されている。アミロイド凝集は、アルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン病などの神経変性疾患、2 型糖尿病の原因タンパクが持つ特徴で、特に近年、神経変性疾患では、アミノ酸配列が同じでもアミロイド線維構造の異なる多型（株）が存在し、型の種類によって誘導される症状（表現型）が異なるというアミロイド凝集体構造と症状の相関が概念として確立しつつある。私たちは、p53 がアミロイド凝集してプリオンのように振る舞うのであれば、p53 凝集体の構造と p53 機能喪失レベルあるいは変異による新たな機能の発現レベルが相関するのではないかと考え、研究に着手した。

本期間では、in vitro で p53 がアミロイド様の凝集体を形成するか検証を進めた。凝集反応の in vitro 解析には大量のタンパクを必要とするため、大腸菌組換えでヒト p53 全長を調製する方法の確立に取り組んだ。全長 p53 は凝集しやすく、可溶性タンパク（マルトース結合タンパク：MBP）と融合すると、p53 の部分で凝集し、その周囲を MBP が覆う可溶性凝集体が得られてしまうことを高速原子間力顕微鏡で明らかにした。そこで、大腸菌内でわずかに存在する可溶性状態の p53 全長を分離することとした。同時に、ホットスポット変異が集中する DNA 結合ドメイン（94-312 番目の範囲のアミノ酸配列）の組換えタンパクを調製した。

可溶性状態の組換えヒト全長 p53 を高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）で観察したところ、3 nm 程度の粒子の周りを 2 つ程度のより小さい領域が絶え間なく拡散運動する様子を野生型、R175H 変異型（構造を変化させる変異 Structure mutation の一つ）の両方で観察することができた。pH を変えてステージ基板と分子の静電相互作用を調整し、運動の変化を観察した結果、3 nm の粒子は、DNA binding domain と Oligomerization domain、小さい領域は N 末端側の transactivation domain に相当すると推定できた。

p53 がアミロイド様の凝集体を形成するか検証するため、アミロイド特有のクロスβ構造を標識する蛍光色素チオフラビン T を用いて、37℃で p53 をインキュベート中にクロスβ構造を形成するか測定した。その結果、特に R175H 変異型全長は明確に蛍光強度の増加を示し、クロスβ構造を形成することを示唆した。R175H の DNA 結合ドメインのみの試料でさらに解析を進めたところ、可溶性状態をインキュベートすると、一般的なアミロイドと同様にチオフラビン T の蛍光強度増加が始まるまでのラグ時間、急激な蛍光強度上昇、一定の強度で飽和する時間と続いていくタイムコースを示した。次に、この凝集体が自己複製能を持つか検証した。一般的なアミロイドは、可溶性凝集体を自身と同じ不溶性型構造に変えて凝集体を増加させるので、可溶性状態の試料に少量の凝集体を加えるとチオフラビン T の蛍光強度は急激に増大して飽和し、ラグ時間が短くなる。しかし、R175H-DNA 結合ドメインの凝集体を少量、可溶性状態の試料に加えてもラグ時間の短縮は見られなかった。また、凝集体の一部を高速 AFM で撮影したところ、現状、線維状の凝集体は観察されていない。

以上の結果は、現状、構造変異型の一つである R175H は凝集過程でクロスβ構造を形成し得るが、自己複製能はない可能性が高いことを示している。今後は、他の変異型でも in vitro の凝集解析を進めるとともに、培養細胞に小さいタグ付きの全長 p53 変異型を発現させ、少量精製して高速 AFM 観察し、細胞内での p53 の立体構造動態も明らかにして、in vitro 解析と比較しながら研究を進める。

研究助成 2019 –がん領域–

研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

所	属	金沢大学ナノ生命科学研究所
氏	名	中山隆宏

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ● 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 ● 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ● 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入する。 なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ● 国内外雑誌を問わない。 ● 印刷中は in press と記入、投稿中の論文はその旨を記載すること。なお学会のアブストラクトは含めない。 ● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
1	T. Watanabe-Nakayama, K. Ono, Acquisition and processing of high-speed atomic force microscopy videos for single amyloid aggregate observation, <i>Methods</i> , 2022,197,4-12, 査読有り
2	H. Nakano, T. Hamaguchi, T. Ikeda, <u>T. Watanabe-Nakayama</u> , K. Ono, M. Yamada, Inactivation of seeding activity of amyloid β -protein aggregates in vitro, <i>J Neurochem</i> , in press, 査読有り
3	B.R. Sahoo, C.L. Souders, <u>T. Watanabe-Nakayama</u> , Z. Deng, H. Linton, S. Suladze, M.I. Ivanova, B. Reif, T. Ando, C.J. Martyniuk, A. Ramamoorthy, Conformational Tuning of Amylin by Charged Styrene-Maleic-Acid Copolymers, <i>J Mol Biology</i> , 2021,434,167385-167385, 査読有り
4	K. Lim, G. Nishide, T. Yoshida, <u>T. Watanabe-Nakayama</u> , A. Kobayashi, M. Hazawa, R. Hanayama, T. Ando, R.W. Wong, Millisecond dynamic of SARS-CoV-2 spike and its interaction with ACE2 receptor and small extracellular vesicles, <i>J Extracell Vesicles</i> , 2021,10,e12170, 査読有り
5	K. Ono, <u>T. Watanabe-Nakayama</u> , Aggregation and structure of amyloid β -protein, <i>Neurochem Int</i> , 2021, 44531,151,105208-105208, 査読有り
6	G. Nishide, K. Lim, M.S. Mohamed, A. Kobayashi, M. Hazawa, <u>T. Watanabe-Nakayama</u> , N. Kodera, T. Ando, R.W. Wong, High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Spatiotemporal Dynamics of Histone Protein H2A Involution by DNA Inchworming, <i>J Phys Chem Lett</i> , 2021, 44308,12,3837-3846, 査読有り
7	M. Qu, <u>T. Watanabe-Nakayama</u> , S. Sun, K. Umeda, X. Guo, Y. Liu, T. Ando, Q. Yang, High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Factors Affecting the Processivity of Chitinases during Interfacial Enzymatic Hydrolysis of Crystalline Chitin, <i>ACS Catal</i> , 2020, 44155,10,13606-13615, 査読有り
8	M.S. Mohamed, M. Hazawa, A. Kobayashi, L. Guillaud, <u>T. Watanabe-Nakayama</u> , M. Nakayama, H. Wang, N. Kodera, M. Oshima, T. Ando, R.W. Wong, Spatiotemporally tracking of nano-biofilaments inside the nuclear pore complex core, <i>Biomaterials</i> , 2020, 44105,256,120198-120198, 査読有り

9	<p><u>T. Watanabe-Nakayama</u>, M. Nawa, H. Konno, N. Kodera, T. Ando, D.B. Teplow, K. Ono, Self- and Cross-Seeding on α-Synuclein Fibril Growth Kinetics and Structure Observed by High-Speed Atomic Force Microscopy, ACS Nano, 2020, 44068,14,9979-9989, 査読有り</p>
10	<p><u>T. Watanabe-Nakayama</u>, B. R. Sahoo, A. Ramamoorthy, K. Ono, High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals the Structural Dynamics of the Amyloid-β and Amylin Aggregation Pathways, Int J Mol Sci, 2020, 43998,21,4287, 査読有り</p>
11	<p>H. Konno#, <u>T. Watanabe-Nakayama</u>#, T. Uchihashi, M. Okuda, L. Zhu, N. Kodera, Y. Kikuchi, T. Ando, H. Taguchi (#Equally contributed), Dynamics of oligomer and amyloid fibril formation by yeast prion Sup35 observed by high-speed atomic force microscopy, Proc Nat Acad Sci U S A, 2020, 43928,117,7831-7836, 査読有り</p>

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ● 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ● 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ● 国内外を問わない。 ● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2020/12/15	単一生体分子の動的プロセス評価に向けた高速 AFM 技術（ブルカー・ジャパン株式会社ウェビナー）、中山隆宏、高速原子間力顕微鏡による医学薬学研究への展開—アミロイド凝集過程とその抑制因子の作用機序の解明を目指して—
2		
3		
4		
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2022 年	第 45 回日本分子生物学会年会
2	2023 年	Research article, Journal of Molecular Biology
3		
4		