

[別紙 1]

論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目 p53 の新規標的遺伝子 *Noxa* によるアポトーシスの制御機構の解析

指導教官 谷口 維紹 教授

東京大学大学院 医学系研究科

平成 9 年 4 月 入学

医学博士課程

病因・病理学 専攻

氏名 織田 恵理

癌抑制因子 p53 の重要な役割の一つとして、細胞がさまざまなストレスを受けたときにアポトーシスを誘導することが知られており、このアポトーシスの誘導は p53 による癌の抑制にも重要な役割を果たしていると考えられている。これまでの研究で、多くの系において p53 によるアポトーシスの誘導は、標的遺伝子の転写活性化を介して行われていることが報告されている。また、遺伝子欠損マウス由来細胞の解析から、p53 によるアポトーシスの誘導はミトコンドリアを介して Apaf-1/カスパーゼ 9 が活性化される経路が重要であることが示されている。p53 の標的遺伝子の一つである Bcl-2 ファミリーの Bax は、この経路を活性化することによりアポトーシスを引き起こすことが知られている。しかし、正常の胸腺細胞は X 線照射により p53 依存的にアポトーシスが誘導さ

れることが知られているが、*Bax* 遺伝子欠損マウスの胸腺細胞では、DNA 損傷時に誘導されるアポトーシスは正常におこること、*p53* 欠損胸腺細胞に *Bax* を発現させても、DNA 損傷時に誘導されるアポトーシスには抵抗性であること、アデノウイルス遺伝子産物 E1A を発現した *Bax* 遺伝子欠損マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) では、抗がん剤処理によるアポトーシスの誘導は、部分的にしか抑制されないことから、*Bax* 以外に重要な *p53* 標的遺伝子が存在することが推測されていた。本論文では、mRNA differential display 法を用いて、X 線照射に応答して *p53* 依存性に転写が誘導される遺伝子、*Noxa* を単離し、その機能解析を行った結果について述べる。

*Noxa* 遺伝子の発現を解析した結果、野生型の MEF で、X 線照射により *Noxa* mRNA の発現が誘導されたが、*p53* 欠損細胞では、この発現誘導がみられなかった。また、*p53* 遺伝子欠損 MEF にアデノウイルスを用いた発現系で *p53* を強制発現させると、*Noxa* の mRNA の発現が誘導された。更に、DNA 損傷時のアポトーシスの誘導が *p53* 依存的に起こることが知られている胸腺細胞でも、X 線照射により *p53* 依存的に *Noxa* の mRNA の発現が誘導された。同時に、X 線照射により *Noxa* 蛋白の誘導も検出された。*Noxa* 遺伝子の解析の結果、プロモーター領域に典型的な *p53* 認識配列が存在することを見出し、この配列を含むプロモーターは *p53* により転写活性化されることを遺伝子導入実験から明らかにした。これらのことから、*Noxa* は *p53* によって直接転写誘導される新規標的遺伝子であると考えられた。

*Noxa* のアミノ酸配列を調べると、アポトーシスの制御にかかわる Bcl-2 ファミリーに高く保存されている Bcl-2 homology (BH) 3 モチーフに似た配列が 2 ヶ所存在し、その他の BH モチーフ (BH1, BH2, BH4) や膜貫通領域は存在しない。このことから、*Noxa* 蛋白は、Bcl-2 ファミリー因子のうち、アポトーシス

を誘導する BH3-only サブファミリーに属することが推測された。実際、アデノウイルスによる発現系を用いて、Noxa をヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を始めとする種々の培養細胞に高発現させると、アポトーシスの誘導が観察された。更に、Noxa により誘導されるアポトーシスが BH3 モチーフを介して起こるかについて調べるために、BH3 モチーフの N 末端のロイシンをアラニンに置き換えた変異体を作製し、そのアポトーシス誘導能を調べた。二つある BH3 モチーフのうち片方にのみ変異を入れた場合、アポトーシス誘導能は野生型に比べて低下しており、両方の BH3 モチーフに変異をいれた場合は完全にアポトーシス誘導能がなくなっていた。このことから、Noxa は BH3 モチーフを介してアポトーシスを誘導することが示された。また、Noxa によるアポトーシスの誘導は、Bcl-2 ファミリーのアポトーシスを抑制する機能をもつ Bcl-XL、Bcl-2 によって抑制された。更に、HeLa 細胞を用いて Noxa の細胞内局在を調べたところ、BH3 モチーフを介してミトコンドリアに局在することが明らかとなった。また、これまでに知られている BH3-only サブファミリーの因子は、他のアポトーシスを制御する Bcl-2 ファミリー因子に結合してアポトーシスを引き起こすことが知られている。そこで、解析した結果、Noxa は Bax とは結合しないが、BH3 モチーフを介してアポトーシス抑制因子である Bcl-XL や Bcl-2 に結合することが見出された。これらの結果から、Noxa が実際に BH3-only サブファミリーに属する因子であると考えられた。

p53 によるアポトーシスの誘導は Apaf-1 やカスパーゼ 9 が活性化される経路が重要であり、アポトーシスの過程でミトコンドリアの膜電位の低下が起こることが、多くの実験系を用いて報告されている。実際に、Noxa を高発現させると、Apaf-1 の活性化を誘導するチトクローム *c* の放出、カスパーゼ 9 の活性化が起こり、ミトコンドリアの膜電位の低下が観察された。これらの結果から、

p53 で考えられている重要なアポトーシス誘導経路に Noxa が作用することが示された。

そこで、実際に p53 によるアポトーシスの誘導に Noxa が関与しているかを調べた。p53 高発現によるアポトーシスの誘導は、主にヒト癌細胞を用いて解析されており、実際に骨肉腫由来 Saos2 等のヒト癌細胞は p53 によってアポトーシスを引き起こすことが知られている。そこで、この目的のために、Noxa のヒトホモログを検索したところ、既知の遺伝子 *APR* と一致することが分かった。しかし、この遺伝子の機能については全く知られていなかった。興味深いことに、マウス *Noxa* 遺伝子は、3つのエキソンからなるのに対し、ヒト *Noxa* 遺伝子はマウス *Noxa* 遺伝子のエキソン 2 がなく、BH3 モチーフが一つしか存在しない。ヒト *Noxa* 遺伝子が p53 によって誘導されるかを、p53 欠損の Saos2 細胞に、アデノウイルスを用いて p53 を発現させて調べた結果、ヒト *Noxa* mRNA の発現が誘導された。また、ヒト *Noxa* のプロモーター領域にも p53 認識配列が存在し、p53 によって直接活性化された。更に、ヒト *Noxa* を HeLa 細胞や Saos2 細胞など様々な細胞に高発現させると BH3 モチーフを介してアポトーシスを引き起こした。これらのことから、同定した遺伝子は *Noxa* のヒトホモログであると考えられた。

そこで、Noxa が p53 によるアポトーシス誘導に関与するかについてアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた実験系で検討した。その結果、Saos2 細胞は p53 の強制発現によってアポトーシスを引き起こすが、p53 の発現によって誘導される Noxa 蛋白の発現を、Noxa mRNA のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入し抑えると、p53 によるアポトーシスの誘導が部分的に抑制された。これらの結果から、Noxa は p53 によるアポトーシスを媒介する新しい因子であることが示唆された。