

【別紙 2】

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 織 田 恵 理

癌抑制遺伝子 *p53* は、DNA 損傷、低酸素状態などのストレス刺激や癌遺伝子の活性化などにより誘導され、転写調節因子としてその標的遺伝子の発現を活性化し、それらの遺伝子産物が細胞周期の停止、DNA 修復、アポトーシスの誘導を行うことにより、癌抑制因子として機能を発揮すると考えられている。本研究は、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、その機能解析を行い、下記の結果を得ている。

1. *Noxa* 遺伝子の発現を解析した結果、野生型のマウス胎仔線維芽細胞 (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、この発現誘導が見られなかった。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。また、*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。

2. Noxa cDNA の塩基配列を決定した結果、103 アミノ酸蛋白質をコードしていることが推測された。この予想されるアミノ酸配列には、Bcl-2 ファミリーに高く保存されている BH3 ドメインに類似するアミノ酸配列が、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 蛋白質は、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。
3. 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、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ると、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、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 に結合することが示された。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。
4. 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。

5. 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。

以上、本論文は p53 の新規標的遺伝子 *Noxa* を単離し、その機能解析から、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を明らかにした。本研究は、p53 によるアポトーシス誘導機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。