

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 織 田 克 利

本研究は、新規 p53 標的遺伝子の単離とその機能解析を通して、癌抑制遺伝子 p53 によるアポトーシス誘導機序の解明を試みたものである。Yeast enhancer trap system 法を用いることによって得られた p53 特異的結合配列をもとに新規 p53 標的遺伝子 *p53AIP1* (p53-regulated Apoptosis Inducing Protein 1) を単離し、この遺伝子が p53 依存性アポトーシス誘導に関与すること、さらに p53 の Ser-46 のリン酸化が、*p53AIP1* の転写活性化を調節し、アポトーシス誘導の選択に重要な役割を果たしていることを下記の実験結果より証明した。

1. Yeast enhancer trap system により p53 特異的結合配列と推測される TCTCTTGCCCGGGCTTGTCG を含む 190bp の DNA 断片を単離し、この配列を含む約 40kb のヒトゲノム DNA の全塩基配列をもとに新規遺伝子 *p53AIP1* の cDNA 断片を同定した。cDNA ライブラリーをスクリーニングし、*p53AIP1* の cDNA 全長を単離し、選択的スプライシングにより、3つの transcripts (α 、 β 、 γ) が存在することを明らかとした。 α 、 β 、 γ はそれぞれ 124、86、108 アミノ酸をコードしていたが、相同性の高い既知の蛋白はみられなかった。p53 結合配列はイントロン 1 に存在し、ゲルシフトアッセイ、レポーターアッセイにより、p53 がこの配列に結合し、転写を活性化することを証明した。
2. 正常型 p53 を有する NHDF 細胞に γ 線照射やアドリアマイシン投与を行い、内因性の *p53AIP1* の発現誘導がおこることを RT-PCR で示した。一方、正常型 p53 を欠失した大腸癌細胞株 SW480 では発現誘導はみられなかった。
免疫細胞染色により、*p53AIP1* の細胞内局在がミトコンドリアであり、ミトコンドリアの膜電位を低下させることを確認した。
グリオーマの細胞株 T98G に *p53AIP1* の発現ベクターを導入し、FACS 解析、TUNEL 法により、アポトーシスが誘導されることを示した。

p53AIP1 のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入すると p53 依存性アポトーシスがほぼ完全に抑制されることが、グリオーマの細胞株 U373MG で示された。以上より、p53AIP1 は p53 依存性アポトーシス誘導に不可欠な mediator であると考えられる。

3. 乳癌細胞株 MCF-7 に、紫外線、 γ 線、アドリマイシンにより DNA 傷害を起こすと、Ser-15、Ser-20 のリン酸化に比べて、Ser-46 のリン酸化は常に遅れてみられる。また、紫外線量を変える実験で、Ser-15、Ser-20 のリン酸化に比べ、Ser-46 のリン酸化は強い線量を必要とし、線量依存性にアポトーシス細胞が増加することを示した。また、p21 に比べ、p53AIP1 は強い線量でのみ発現が誘導された。

p53 を発現するアデノウィルスベクターを p53 を欠失した肺癌細胞株 H1299 に導入した時も、Ser-46 のリン酸化は Ser-15、Ser-20 より遅れて生じ、p53AIP1 の発現も p21 より遅れて観察された。また、感染濃度を変えた時にも、Ser-46 のリン酸化、p53AIP1 の発現誘導に相関を認めた。

p53 Ser-46 を Ala に変えた mutant (p53S46A) を導入したところ、コドン 46 のリン酸化もアポトーシス誘導も認められず、また、p53 標的遺伝子の中で p53AIP1 だけがほとんど発現誘導されなかった。

本研究が、p53 による細胞周期停止とアポトーシス誘導の選択について提唱するモデルは以下のように要約される。DNA に傷害が起こったとき、まず p53 は p21 を発現誘導し、細胞周期を止めると同時に DNA 修復を試みるが、損傷が高度で修復不能な時には、Ser-46 のリン酸化を介して p53AIP1 等の発現を誘導し、アポトーシスを引き起こす。

p53 によるアポトーシス誘導機序の解明において、本研究は重要な貢献をしているのみならず、p53AIP1 遺伝子を導入することによる、新たな遺伝子治療の可能性も提唱しており、学位の授与に値するものと考えられる。