

論文の内容の要旨

論文題目 新規 p53 標的遺伝子の単離および機能解析

指導教官 中村 祐輔 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成13年4月 1日 入学

医学博士課程

病因病理学専攻

氏名 穴澤嘉雄

新規 p53 標的遺伝子の単離および機能解析

p53 はヒト癌の約半数以上において突然変異が確認される癌抑制遺伝子で、p53 蛋白質は種々のストレスに応答し標的遺伝子の活性化を遂行する転写活性化因子として生体内で機能している。生体が抗ガン剤、紫外線照射等の DNA ダメージを受けた際、その損傷程度が軽微である場合は細胞周期を停止し、DNA 修復を促進し、損傷が深刻で修復不可能な場合はダメージを受けた細胞をアポトーシスに誘導することで生体の恒常性を維持している。また、p53 依存性アポトーシス関連遺伝子の誘導には、p53 蛋白質の適切な翻訳後修飾が必要であることが報告されている。

p53 アデノウイルスベクターを用いた癌遺伝子治療において、*p53* 遺伝子導入が必ずしも癌細胞にアポトーシスを誘導しない理由として、p53 蛋白質の適切な翻訳後修飾の欠如があると考え、本研究では p53 遺伝子治療に代わる新たな遺伝子治療候補遺伝子の検索を目的とし、アポトーシスをより優位に誘導することが報告されている変異型 p53 (121F) を活用し、p53 依存性アポトーシスに関与する遺伝子の単離とその機能解析を行った。p53 蛋白質のアミノ酸残基 121 位 Ser を Phe に置換した変異型 p53 (121F) が正常型 p53 (p53-wt) より優位にアポトーシスを誘導する背景には p53 依存性アポトーシスに関わる標的遺伝子が特異的に活性化されていると考え、cDNA マイクロアレイを用いて、p53-wt に比べ 121F によって強力に発現誘導された遺伝子を選別した。本研究では中でも発現誘導の著明であった *STAG1* 遺伝子の機能解析を行った。

STAG1 は外来性 p53-wt による発現誘導および外来性 121F による発現誘導亢進を示すことがノザンおよびウェスタン解析により確認され、クロマチン免疫沈降法から *STAG1* 遺伝子のイントロン 1 に存在する p53 結合部位に外来性 p53-wt および外来性 121F が結合することが明らかとなった。また、アドリアマイシン、ガンマ線照射および紫外線照射により *STAG1* 遺伝子が内在性 p53 依存性に発現誘導を受けることがノザン解析により明らかとなった。LS174T (*p53*^{+/+}) に UV 照射を行うと、STAG1 蛋白質は発現上昇しアポトーシスが誘導されたが、siRNA によりこの発現を抑制したところ、アポトーシスは抑制された。また、*STAG1* 遺伝子の強制発現による colony formation assay では肺癌細胞株 H1299, 大腸癌細胞株 HCT116, グリオーマ細胞株 T98 において顕著な増殖抑制作用を認め、アデノウイルスベクターを用いた *STAG1* 遺伝子導入は癌細胞株においてアポトーシスを誘導した。そこで 8 種の癌細胞株に対するアポトーシス誘導能を検討した結果、Ad-*STAG1* は 3 種の癌細胞株において Ad-*p53wt* より強力なアポトーシス誘導能を持つことが示された。以上の結果から *STAG1* は 121F によって誘導される p53 標的遺伝子であり、p53 依存性アポトーシスの新しい実行因子の一つである可能性が示されたと同時に Ad-*p53* に代わる次世代型遺伝子治療候補遺伝子としての可能性が示された。