

審査の結果の要旨

氏名 谷川千津

ヒトの癌の約半数で変異の見られる代表的な癌抑制遺伝子である *p53* は転写因子であり、その標的遺伝子を介して細胞周期の停止、アポトーシスの誘導、DNA 修復といった様々な機能を発揮する。本研究は、これら多種多様な遺伝子を複合的に制御することによって癌化抑制能を発揮する、*p53* の機能の全貌を解明するため、cDNA マイクロアレイを利用し網羅的に未知の *p53* 標的遺伝子群のスクリーニングし、さらに、個々の標的遺伝子の機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 変異型 *p53* 遺伝子を有する脳腫瘍の細胞株である U373MG に、正常型 *p53* 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (Ad-*p53*) と、対照群として *LacZ* 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (Ad-*LacZ*) を感染させ、時系列で RNA を回収、これらを標識化してプローブとして利用し、cDNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、コントロールと比較して Ad-*p53* を感染させた系で mRNA の顕著な発現誘導が見られた遺伝子群を *p53* 標的遺伝子の候補として選別し、それらの遺伝子について RT-PCR を施行することにより、cDNA マイクロアレイの結果を確認した。本研究ではその中のひとつである *p53RDL1* (*p53*-regulated receptor for death and life) を新規 *p53* 標的遺伝子として単離した。
2. ESTの配列をもとにcDNAライブラリースクリーニングを行い、mRNAの全長および全アミノ酸配列を決定した。その結果、*p53RDL1*は、C末側にdeathドメインを有する1回膜貫通型タンパク質をコードし、軸索誘導および神経系アポトーシスに重要な働きを持つラットのUnc5H2と高い相同性（アミノ酸配列で92%が一致）を有していることがわかった。

3. イントロン 1 に存在する p53 結合候補配列に p53 タンパク質が結合し、reporter assay により p53 依存性に発現が誘導されることが明らかとなり、p53 の直接の標的遺伝子であることが証明された。

4. アンチセンスオリゴにより *p53RDL1* の発現を抑制すると、p53 依存性のアポトーシスが抑制され、*p53RDL1* は p53 依存性のアポトーシス誘導の重要な mediator であることが推測された。

5. アデノウイルスを用いた *p53RDL1* 遺伝子導入は、Glioblastoma 細胞株に対して顕著にアポトーシスを誘導した。また、この *p53RDL1* によるアポトーシス誘導には、カスパーゼを介した 412 残基のアスパラギン酸での切断による活性化が必須であることを証明した。

6. ラット *Unc5H2* との相同性より *p53RDL1* のリガンドと予想される、*Netrin-1* のリコンビナントタンパク質を作製し、それが生理活性を持つことを示した。GST-pull down assay にて *p53RDL1* と *Netrin-1* は実際に結合する事、また、その結合によって、*p53RDL1* の 412 残基のアスパラギン酸での切断が阻害され、*p53RDL1* および p53 依存性アポトーシスが顕著に抑制されることを明らかにした。またこの現象は神経前駆細胞を用いた実験においても確認された。

以上、本論文は、cDNA マイクロアレイを利用した新規 p53 標的遺伝子群の網羅的スクリーニングにより単離された *p53RDL1* の解析から、この遺伝子がアポトーシス誘導に関与すること、およびリガンドである *Netrin-1* の存在・結合によりそのアポトーシス誘導が抑制されることを明らかにした。

本研究は、p53 が *p53RDL1* の発現誘導を介して、細胞の生死のバランスを決定している可能性を示唆するものであり、代表的な癌抑制遺伝子である p53 の機能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。