

## 論文審査の結果の要旨

氏名 小田 健昭

DNA は生命の根幹である遺伝物質であり、細胞を構成するタンパク質の設計図でもあるため、細胞内で最も重要な役目を担う物質の一つと考えられる。DNA は外部からの物理的また化学的な刺激によって損傷を受ける。これらの損傷は結果的に細胞の形質を変え、細胞が帰属する組織や個体などに重大な欠陥をもたらすことになる。そのため、細胞はこの DNA 損傷に対する防御反応を備えている。DNA 損傷に対する細胞の制御機構は多くの遺伝子による分子基盤によって支えられ、複雑、巧妙に成り立っている。

この分子基盤の主要構成因子の一つが癌抑制遺伝子 p53 である。p53 遺伝子の変異・欠損は約 50% の腫瘍において見出されている。p53 は転写因子で、多くの p53 標的遺伝子が同定されている一方、包括的なゲノム解析などから、未だに明らかになっていない多くの標的遺伝子が存在することが予測されている。

近年、miRNA などの低分子 RNA が発見され、シグナル特異的また配列特異的な mRNA の分解制御がさらに注目されている。mRNA の配列特異的な分解制御は mRNA の 3'UTR に依存的であることが多く、その中でも ARE はその分解を制御する配列として半減期の短い mRNA に見出されている。ARE が存在する mRNA として Bim-mRNA が知られている。Bim は BH3-only ファミリーに属し、その遺伝子産物は Bcl2 と直接相互作用することによって、アポトーシスを誘導する。Bim の発現制御にも ARE を介した mRNA が関与していると考えられており、その制御機構が注目されている。

本研究では、p53 依存的に DNA 損傷によって発現誘導される遺伝子として、新規 RNA 結合遺伝子 D8 を同定した。さらに、D8 が Bim-mRNA に相互作用し安定化することによって、DNA 損傷によって誘導されるアポトーシスに重要な役割を果たしていることを明らかにした。

D8 タンパク質は N 末端に二つの hnRNP K homology (KH) ドメイン、C 末端に RING フィンガードドメインを持つ 569 アミノ酸からなるタンパク質である。本研究では、プロモーターアッセイやクロマチン免疫沈降法など詳細な発現解析の結果、p53 が D8 プロモーターに直接結合し、D8 の転写を活性化していることが明らかになった。また、DNA 損傷を引き起こす様々な薬剤を細胞に添加することによって、D8 の発現が誘導されることが明らかになった。さらに、siRNA によって p53 の発現を抑制すると、DNA 損傷による D8 の発現誘導が阻害された。この結果によって、D8 が DNA 損傷によって p53 依存的に発現誘導されていることを示された。

D8 の生体内における機能、特に DNA 損傷によって発現誘導される意義を明らかにするために、培養細胞へ D8 を強制発現し、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、D8 を強制発現した細胞ではアポトーシスが起きていることが確認された。さらに、siRNA によって D8 の発現が抑制された細胞群で

は、p53 の強制発現や DNA 損傷によって誘導されるアポトーシス細胞が顕著に減少していた。この結果から、DNA が損傷を受けると活性化した p53 が D8 の発現誘導することによってアポトーシスを誘導していると考えられ、D8 が DNA 損傷に対する生体の防御機構の中で重要な役割を果たしていることが示唆された。

KH を欠損させた D8 は細胞増殖の抑制能がほとんどないことから、D8 のアポトーシス誘導能には KH ドメインが重要であると考えられる。D8 によるアポトーシス誘導の機序を明らかにするために、D8 が KH ドメインを介して結合する mRNA の探索を行った。D8 の強制発現によって Bim の mRNA が安定化していることが見出され、さらに、細胞内で D8 と Bim-mRNA が相互作用していることが示唆されたため、この相互作用を *in vitro* においても検証した。*in vitro* UV クロスリンクアッセイ及び *in vitro* degradation アッセイの結果、D8 は KH ドメインを介して Bim<sup>3'</sup>UTR 内の ARE に結合することにより、Bim-mRNA を安定化していることが示唆された。さらに、D8 のアポトーシス誘導能への Bim の関与を検証したところ、siRNA によって Bim の発現が抑制された細胞群では、D8 の強制発現によって誘導されるアポトーシス細胞が顕著に減少していた。D8 が Bim-mRNA を安定化することによって Bim の発現を促進し、アポトーシスを誘導していることが明らかになった。

以上のように、本研究では DNA 損傷によって p53 依存的に転写誘導される新規遺伝子 D8 を同定した。さらに、D8 が Bim mRNA<sup>3'</sup>UTR に直接結合し、Bim mRNA を安定化することによってアポトーシスを誘導することが明らかになった。D8 を抑制した細胞は DNA 損傷によるアポトーシスに対して耐性を得ることから、D8 は DNA 損傷によるアポトーシス誘導に重要な役割を果たしていることが示された。すなわち、DNA 損傷に対する細胞応答における転写後調節の重要性を明らかにしたものであり、これまで示されていなかった機構を明らかにした極めて重要な研究である。なお、本論文は廣子貴俊、秋山徹との共同研究であるが、いずれも論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士(理学)の学位を授与できると認める。