

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 洋

本研究は悪性腫瘍を含む多くの病態で重要な役割を演じていると考えられるマイクロRNA (miRNA)の発現調節メカニズムを明らかにするため、miRNAの生合成機構と癌抑制遺伝子群の関連を探索したものであり、下記の結果を得ている。

1. 大腸癌などの癌種で発現低下が認められるmiR-143/145の発現が細胞外の環境変化によって変動する可能性を検討した結果、これらのmiRNAがDNA傷害性抗癌剤であるdoxorubicinによって発現誘導されることが示された。このmiR-143/145の上昇において、miRNA一次転写産物(pri-miRNA)、成熟型miRNAの発現パターンを比較した結果、pri-miRNAの発現レベルが変化しないにも関わらず成熟型miRNAが上昇することが示された。

2. DNA損傷に伴うmiRNAの発現変動のプロファイリングとp72欠損マウスにおけるmiRNAの発現プロファイリングの*in silico*での比較解析をもとに、miR-143/145に加えて、全てではないが一部のmiRNA (miR-15a-16-1/-23a-26a-103/-203/-206) が同様に誘導されることが示された。これらの成熟型miRNAの発現上昇は、pri-miRNAの上昇を伴わない一方で、miRNA前駆体(pre-miRNA)の上昇を伴い、pri-miRNAからpre-miRNAへのプロセッシングを担うDroshaによるプロセッシング亢進に付随するものである可能性が示唆された。

3. DNA損傷に伴うmiRNAの発現上昇において、DNA損傷応答の主要なメディエーターであるp53およびDEAD-box型RNA helicaseであるp68/p72の関与を解析した結果、DNA損傷に伴う成熟型miRNAの発現上昇がp53の欠損あるいは、p53/p68/p72の発現低下 (siRNAによるノックダウン) によって抑制されることが示された。

4. DNA損傷によって誘導されるmiRNAが細胞増殖を負に制御することがWST-8アッセイおよび細胞周期解析によって示された。また、*in silico*での解析をもとに、CDK6やK-Rasといった重要な細胞増殖調節因子がこれらのmiRNAの新規の標的遺伝子であることがルシフェラーゼアッセイおよびウエスタンブロットアッセイにより示された。

5. p53およびmiRNAの生合成を担うDrosha複合体との相互作用を免疫沈降法により解析した結果、p53がp68/p72依存的あるいはRNA依存的にDrosha複合体と相互作用することが示され、また、この相互作用は、p53の癌抑制遺伝子としての主要な機能を担うDNA

結合ドメインを介することが示された。Drosha複合体のプロセッシング活性を*in vitro*で評価する実験系において (*in vitro* processing assay), DNA損傷に反応してp53と相互作用したDrosha複合体がmiR-16/143に対してより強い切断活性を有することが示された。このプロセッシング活性の上昇は, Drosha複合体とp53の*in vitro*での混合によっても再構築可能であることが示された。プロセッシング活性を*in vivo*で評価する実験系でもp53依存性のプロセッシング活性の亢進が示された。

6. 悪性腫瘍で認められる変異型p53のmiRNAプロセッシングに与える影響を検討した結果, 変異型p53が野生型p53とは逆に, miR-16/143などのmiRNAのプロセッシングを減弱させることが示された。免疫沈降法によるDrosha複合体とp68の結合の解析の結果により, 変異型p53はDrosha複合体とp68の結合に干渉し減弱させることが示された。

以上, 本論文はmiRNA生合成機構とDNA損傷反応および癌抑制遺伝子p53の関連を探索した結果, p53がmiRNA生合成を担うDrosha複合体と相互作用しmiRNA生合成機構を制御することを明らかにした。本研究は代表的な癌抑制遺伝子であるp53のこれまで知られていなかった新たな機能を明らかにし, 発癌および癌抑制機構におけるmiRNAの役割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。