

学 位 論 文 題 名

Autoinhibitory Regulation of p73 by $\Delta Np73$ to Modulate
Cell Survival and Death Through a p73-Specific Target
Element Within the $\Delta Np73$ Promoter

($\Delta Np73$ の発現誘導を介した p73 の自己抑制調節機構の同定
および同機構による細胞死制御の解析)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

p53 に対する初めての相同遺伝子産物として分離同定された p73 は、p53 と同様に p53 標的遺伝子群の転写誘導を介して、癌細胞の細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導作用を示すことから、p53 と並ぶ癌抑制遺伝子の候補として注目されている。しかしながら、各種悪性腫瘍における p53 の機能喪失を伴う変異が 50% を越えるのに対し、p73 で検出される変異は極めて稀である。さらに、p53 のノックアウトマウスでは自然発がんが認められるのに対して、p73 のノックアウトマウスでは自然発がんは観察されず、むしろ発生過程における異常すなわち水頭症などの神経系異常や、上気道の慢性炎症といった免疫異常を示す。これらの観察結果は、p73 が p53 とは異なる生理学的機能を持つ可能性を示唆している。興味深いことに、最近 p53 依存性の神経細胞死を阻害し、神経細胞の発生・分化を調節する機能を持つ p73 の転写活性調節ドメインを欠いた変異体 ($\Delta Np73$) の存在が明らかになった。転写活性調節ドメインを有する p73 (以下、TAp73) および $\Delta Np73$ は同一の遺伝子由来の産物であるが、 $\Delta Np73$ の開始エクソンは p73 のイントロン 3 上に存在していることから、両者の発現は異なるプロモーターによって制御されていると考えられている。しかしながら、 $\Delta Np73$ の発現調節機構の詳細は不明であった。本研究では、シスプラチン処理による神経芽細胞腫のアポトーシス誘導過程において、TAp73 の蓄積に伴う $\Delta Np73$ の発現誘導を見出し、その発現調節機構を明らかにするとともに、 $\Delta Np73$ と TAp73、および p53 との物理的ならびに機能的相互作用について解析を行った。

神経芽細胞腫より樹立された SH-SY5Y 細胞株に対して、シスプラチン処理によるアポトーシス誘導刺激を加えると、TAp73 α の蓄積に伴って抗 p73 α 抗体で特異的に検出される約 62kDa の蛋白質の発現誘導が観察された。 $\Delta Np73$ に対する特異抗体を用いたウェスタン法によって、この 62kDa の蛋白質は $\Delta Np73\alpha$ であることが明らかにな

った。また、アデノウイルスベクターを利用した TAp73 および p53 の強制発現実験から、deltaNp73alpha の発現誘導は p53 によっては検出されず、TAp73 によって転写レベルで調節されていることが示唆された。次に、TAp73 による deltaNp73 の転写調節機構を詳細に解析する目的で、p73 のイントロン 3 上に存在する deltaNp73 のプロモーター領域を含む約 2.9kb の DNA 断片をクローニングするとともに、この領域に対する系統的な欠失変異体を作成し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを試みた。その結果、deltaNp73 のプロモーター領域の -76 から -57 (deltaNp73 のエクソン 1 の開始点を +1 とする) の位置に存在する p53 結合配列に類似した配列に依存した TAp73 によるレポーター活性の顕著な上昇が観察された。さらにゲルシフトアッセイによって、TAp73 がこの配列に特異的に結合するが、同一の実験条件下では p53 は結合しないことが認められた。この実験結果は、TAp73 が特異的に deltaNp73 を発現誘導するという分子機構の一端を物語っていると考えられる。

一方、細胞粗抽出液に対する免疫沈降実験から deltaNp73 は TAp73 および p53 と細胞内で物理的に結合していることが示唆された。また、p53 の標的遺伝子である *MDM2*、*Bax*、および deltaNp73 のプロモーターに対するレポーターアッセイから、p53 および TAp73 の転写活性化能は deltaNp73 によって、著しく阻害されることが示された。従って、deltaNp73 による p53 と TAp73 の転写活性化能の阻害は、両者の直接結合による複合体形成によるものであると考えられる。

さらに、TAp73 に依存した神経芽細胞腫のアポトーシスに対する deltaNp73 の効果を検討した。神経芽細胞腫由来の細胞株 SK-N-BE に TAp73alpha を強制発現することによって誘導されるアポトーシスは、deltaNp73alpha を同時に強制発現させることによって抑制された。また、シスプラチン処理による p53 と p73 の蓄積を介した SH-SY5Y 細胞のアポトーシスは、deltaNp73 を強制発現させることにより阻害された。従って、これらの実験結果は deltaNp73 が TAp73 の転写活性化能のみならず、神経由来の細胞に対するアポトーシス誘導能を顕著に阻害する機能を持つことを示唆している。

本研究より得られた実験結果から、p73 はイントロン 3 上に存在する p73 結合配列を介して、転写活性調節ドメインを欠いた変異体である deltaNp73 を発現誘導することにより、自らの転写活性化能ならびにアポトーシス誘導能を阻害する機能をもつことが判明した。最近、乳癌や卵巣癌などで p73 の発現レベルが、正常組織に比べて癌組織で亢進していることが相次いで報告されたが、これらの観察結果は p73 の高発現に伴う deltaNp73 の発現誘導がこれらの癌の発生、進展に密接に関与している可能性を示唆している。本研究で明らかになった p73 による deltaNp73 を介した自己抑制調節機構は、細胞の生存と死ならびに癌化を制御する重要な分子機構の一つであると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

Autoinhibitory Regulation of p73 by $\Delta Np73$ to Modulate Cell Survival and Death Through a p73-Specific Target Element Within the $\Delta Np73$ Promoter

(deltaNp73 の発現誘導を介した p73 の自己抑制調節機構の同定
および同機構による細胞死制御の解析)

p53 に対する初めての相同遺伝子産物として 1997 年に分離同定された p73 は、p53 と同様に p53 標的遺伝子群の転写誘導を介して、癌細胞の細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導作用を示す。また、各種がん細胞で多くの LOH が認められる 1p36 に位置する。これらのことから、p53 と並ぶ癌抑制遺伝子の候補として注目されている。しかしながら、各種悪性腫瘍における p53 の機能喪失を伴う変異が 50% を越えるのに対し、p73 で検出される変異は極めて稀であり、がん組織での発現は正常組織より高い。さらに、p53 のノックアウトマウスでは自然発がんが認められるのに対して、p73 のノックアウトマウスでは自然発がんは観察されず、むしろ発生異常を示す。これらの観察結果は、p73 が p53 とは異なる生理学的機能を持つ可能性を示唆している。神経芽細胞腫より樹立された SH-SY5Y 細胞株に対して、シスプラチン処理によるアポトーシス誘導刺激を加えると、TAp73 α の蓄積に伴って抗 p73 α 抗体で特異的に検出される約 62kDa の蛋白質の発現誘導が観察された。 $\Delta Np73$ に対する特異抗体を用いたウェスタン法によって、この 62kDa の蛋白質は $\Delta Np73\alpha$ であることが明らかになった。また、アデノウイルスベクターを利用した TAp73 および p53 の強制発現実験から、 $\Delta Np73\alpha$ の発現誘導は p53 によっては検出されず、TAp73 によって転写レベルで調節されていることが示唆された。次に、 $\Delta Np73$ のプロモーター領域を含む約 2.9kb の DNA 断片をクローニングするとともに、この領域に対する系統的な欠失変異体を作成し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを試みた。その結果、 $\Delta Np73$ のプロモーター領域の -76 から -57 の位置に存在する p53 結合配列に類似した配列に依存した TAp73 によるレポータ

一活性の顕著な上昇が観察された。さらにゲルシフトアッセイによって、TAp73がこの配列に特異的に結合するが、同一の実験条件下ではp53は結合しないことが認められた。この実験結果は、TAp73が特異的に Δ Np73を発現誘導するという分子機構の一端を物語っていると考えられる。p53の標的遺伝子であるMDM2、Bax、および Δ Np73のプロモーターに対するレポーターアッセイから、p53およびTAp73の転写活性化能は Δ Np73によって、著しく阻害されることが示された。神経芽細胞腫由来の細胞株SK-N-BEにTAp73 α を強制発現することによって誘導されるアポトーシスは、 Δ Np73 α を同時に強制発現させることによって抑制された。また、シスプラチン処理によるp53とp73の蓄積を介したSH-SY5Y細胞のアポトーシスは、 Δ Np73を強制発現させることにより阻害された。従って、これらの実験結果は Δ Np73がTAp73の転写活性化能のみならず、神経由来の細胞に対するアポトーシス誘導能を顕著に阻害する機能を持つことを示唆している。

審査に当たってまず浅香教授より1)癌組織でのp73抗体を用いた免疫染色、2)TAp73と Δ Np73の発現調節などの質問があった。1)癌組織中でp73の増加が免疫染色で増加していることが確認できるが、その場合もp73には変異が見られないこと、2) Δ Np73の発現調節がp73のリン酸化など、蛋白の修飾が関与していると予想され、それについて実験中であつたこと等の回答があつた。藤堂教授より臨床検体での Δ Np73の発現と予後との関連性についてなどの質問がされ、neuroblastomaでは Δ Np73の発現量と予後が相関し、 Δ Np73の発現が高いものは予後が悪いという論文が最近発表されたことを紹介し、回答が行われた。守内教授からはp73 knockout-mouseのphenotypeについて確認が行われ、さらに、 Δ Np73のプロモーター解析の詳細についての質問があり、自らの実験結果と他の遺伝子におけるプロモーターとenhancerとの関係などとの違いについて回答が行われた。

この論文はp53とp73との生体内での機能の違いを Δ Np73の誘導を通して説明されることを示した世界で初めての報告であり高く評価され、今後、未知の部分が多い発生や発癌におけるp73の役割が分析されていく際に重要な理論的根拠になることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。