

学位論文抄録

腫瘍抑制因子 p53 の新規標的遺伝子およびアポトーシス制御因子としての
UNC5A の同定
(UNC5A , a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 ,
is a regulator of apoptosis.)

宮本 裕士

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻消化器外科学

指導教員

馬場 秀夫 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻消化器外科学

学位論文抄録

【目的】UNC5A は軸索ガイダンス分子であり, netrin-1 の受容体として, 神経の発生と分化に関して重要な役割を担っている. 最近の報告では, UNC5A を含む軸索ガイダンス分子が, 非神経性細胞においてアポトーシスを制御していることが明らかとなった. 今回, UNC5A が p53 の下流の標的遺伝子としてアポトーシスを制御しているかどうかを検討した.

【方法】p53 を過剰発現させた場合(外因性 p53)と, p53-knockdown 細胞と control 細胞に DNA 障害を加えた場合(内因性 p53)の UNC5A に対する RT-PCR 法を行い, UNC5A が p53 依存性の発現を示すか確認した. クロマチン免疫沈降 (ChIP アッセイ) 及びレポーターアッセイを用いて, UNC5A の p53 結合候補配列に p53 蛋白が結合し, 転写活性を有しているか確認した. コロニーフォーメーションアッセイを用いて, UNC5A が細胞増殖抑制能を有しているか確認した. アデノウイルス UNC5A を様々な細胞株へ感染させた後に FACS 解析を行い, アポトーシスが誘導されるか確認した. さらに, この時のカスパーゼ 3 活性を定量することで, カスパーゼを介したアポトーシスが誘導されるか確認した. p53(+/+)マウスと p53(-/-)マウスにガンマ線を照射し, UNC5A に対する RT-PCR 法を行うことで, 生体内で UNC5A が p53 依存性の発現を示すか確認した.

【結果】UNC5A は, 外因性および内因性の p53 によって, 共に強く発現が誘導され, p53 依存性の発現を示すことを明らかにした. また, ChIP アッセイでは, p53 蛋白が UNC5A 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列と結合することを明らかにした. この塩基配列が p53 依存性の転写活性を有することをレポーターアッセイで確認し, UNC5A が p53 の直接の標的遺伝子であることを明らかにした. コロニーフォーメーションアッセイにおいて, UNC5A の過剰発現により, U373MG (神経膠芽腫細胞株) と T98G (神経膠芽腫細胞株) の 2 つの細胞株において有意にコロニーの増殖が抑制された. また, UNC5A は, LS174T (大腸癌細胞株), U373MG (神経膠芽腫細胞株), SH-SY5Y (神経芽細胞腫細胞株), SKNAS (神経芽細胞腫細胞株) などの様々な癌細胞株で, カスパーゼ 3 の活性化を介して, アポトーシスを誘導した. ガンマ線照射された p53(+/+)マウスの脾臓と結腸において, UNC5A の発現が強く誘導され, p53(-/-)マウスでは発現誘導が認められなかった. これらの結果から, 生体内においても UNC5A の転写が p53 により制御されることが示唆された.

【結論】以上のことから, UNC5A が p53 による転写制御を受ける新規標的遺伝子であり, p53 依存性アポトーシスにおいて重要な役割を果たしていることが明らかとなった.