

Title	Identification of Seven Genes Regulated by Wild-Type p53 in a Colon Cancer Cell Line Carrying a Well-Controlled Wild-Type p53 Expression System
Author(s)	岡村, 修
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41807">https://hdl.handle.net/11094/41807</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	おがむら しょう 岡村 修
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15307 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Identification of Seven Genes Regulated by Wild-Type p53 in a Colon Cancer Cell Line Carrying a Well-Controlled Wild-Type p53 Expression System (正常型 p53発現制御系導入の大腸癌細胞株を用いた正常型 p53標的遺伝子7個の同定)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人  (副査) 教授 高井 義美 教授 野口眞三郎

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

癌抑制遺伝子 p53 蛋白の様々な生理機能は、p53 によって発現が調節されている標的遺伝子 (p53 target gene) の産物を介していると考えられているが、その全貌は依然として明らかではない。そこで differential display 法 (DD 法) を用いた p53 target gene の同定および機能解析により、p53 シグナル伝達機構の一端の解明を試みた。

#### 【方法】

- (1) wild type p53 を持たない大腸癌細胞株 (SW480) に外因性遺伝子を強制発現させる系である LacSwitch Expression System を導入し、IPTG 添加にて外因性 p53 (wild-type または mutant-type) もしくは chloramphenicol acetyltransferase (CAT) を強制発現。
- (2) 外因性各遺伝子の強制発現後経時的に採取した RNA を用いて DD 法を行い、mutant-type p53、CAT の強制発現時には変化せず wild type p53 の強制発現時のみ経時的に発現の変化する遺伝子断片 (DD fragment) を単離。
- (3) 同定遺伝子の経時的発現変化を RT-PCR、northern blot にて再確認。
- (4) cDNA library screening、5'-RACE により遺伝子全長を同定。
- (5) 新規遺伝子についてはその機能解析。

#### 【結果】

- (1) 計30セット (anchor primer ; GT15MT, arbitrary primers ; AP-1 ~30) の DD 法を施行し、wild-type p53 の強制発現時のみに経時的に発現の増加する DD fragment 9 個、減少する DD fragment 11 個が得られた。
- (2) 上記 DD fragment 20 個をサブクローニング、シークエンス決定の後、RT-PCR により発現パターンが再確認された 9 個の遺伝子をデータベース利用にて homology search を行った結果、wild-type p53 により発現が誘導される遺伝子 4 個 [isozyme 6 of aldehyde dehydrogenase (ALDH 6)、subunit I of cytochrome c oxidase (COI) および未知遺伝子 2 個]、抑制される遺伝子 5 個 [protein-tyrosine kinase (Syk)、high mobility group chromosomal protein 17 (HMG-17)、transferrin receptor、human alpha-tubulin、sds22-like protein] を同定した。

#### 【考察】

今回同定された 9 個の p53 target gene うち既知遺伝子 7 個については、p53 の直接の標的遺伝子であると報告されているものはないが、p53 蛋白の重要な機能である細胞周期制御やアポトーシスとの関連が報告されている。すな

わち ALDH 6 は抗癌剤耐性を持つ癌細胞において ALDH 1 の発現の増強、COI はミトコンドリアの respiratory system に重要な役割、Syk は活性化により radiation-induced apoptosis に関与、HMG-17 は染色質ファイバーの伸長構造の誘導により転写が増強、transferrin receptor は休止細胞が活性化され分裂する際に誘導、tubulin は Jurkat T cell において ZAP-70 や Vav と相互作用、sds22 は metaphase~anaphase へ移行中の染色体分裂に必要ななどである。

また wild-type p53 により誘導される未知遺伝子 2 個 (TP53TG 2、TP53TG 3) についても現在機能解析中である。このうち TP53TG 2 は  $\gamma$  線・UV 照射や adriamycin 添加による DNA damage にてその発現が増加すること、colony formation assay にて細胞増殖抑制効果を示すこと、作成した抗 TP53TG 2 抗体による免疫染色にて核蛋白であることなどの現在までのデータから、p53 target gene として p53 の機能発現に重要な役割を担っている可能性が示唆されている。

以上のことより p53 蛋白は細胞周期制御、アポトーシスなどの機能発現を、今回同定された 9 個の遺伝子を含めた種々の p53 標的遺伝子を介して行っていると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、differential display 法を用いた p53 標的遺伝子の新規同定および機能解析により、癌抑制遺伝子 p53 蛋白の生理機能メカニズムの一端の解明を目的としたものである。

p53 標的遺伝子として新規同定された 7 個の既知遺伝子 [isozyme 6 of aldehyde dehydrogenase (ALDH 6)、subunit I of cytochrome c oxidase (COI)、protein-tyrosine kinase (Syk)、high mobility group chromosomal protein 17 (HMG-17)、transferrin receptor、human alpha-tubulin、sds22-like protein] はそれぞれ細胞分裂、アポトーシス、薬剤耐性といった生物学的機能との関連が文献上示唆されていたが、いずれも p53 の直接の標的遺伝子として現在まで報告のない遺伝子であった。また新規 p53 標的遺伝子と同定した 2 個の未知遺伝子 [TP53TG 2、TP53TG 3] のひとつ (TP53TG 2) は核タンパクをコードする遺伝子であり、p53 結合配列の存在、正常 p53 を持つ細胞株へのストレス負荷による TP53TG 2 の発現誘導、正常 p53 欠落細胞株への TP53TG 2 導入による細胞増殖抑制作用が認められたことより、p53 の直接の標的遺伝子として重要な役割を担っていることが示唆された。

これらの結果は p53 シグナル伝達機構の解明に寄与するものであり、本研究は学位に値する業績と考える。