



Title	Necdin Regulates p53 Acetylation via Sirtuin1 to Modulate DNA Damage Response in Cortical Neurons
Author(s)	長谷川, 孝一
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49828
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	長谷川 孝一
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 22715 号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体生理医学専攻
学位論文名	Necdin Regulates p53 Acetylation via Sirtuin1 to Modulate DNA Damage Response in Cortical Neurons (NecdinはSirtuin1を介するp53アセチル化を制御して大脳皮質ニューロンのDNA障害反応を調節する)
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 和明 (副査) 教授 岡田 雅人 教授 三木 裕明

論文内容の要旨

〔目的〕

Necdinは分裂終了したニューロンや骨格筋において、細胞の増殖やアポトーシスを抑制し、その分化状態の安定性に重要な役割を果たしている。一方、ニューロンにおける内在性のアポトーシス誘発因子として知られている癌抑制遺伝子p53は、その転写活性化領域においてNecdinと結合し、それによって転写活性やアポトーシスの抑制を受ける。このように分化したニューロンにおいてNecdinは細胞の生存や安定性を保つ訳であるが、p53の転写活性をどの様に調節しているかは明らかになっていない。一方、ストレス反応、エネルギー代謝、寿命の制御に重要な役割を果たすSirtuin1(Sirt1)は、p53を脱アセチル化する事によって、p53を介したアポトーシスに関連のある遺伝子の転写を抑制する。そこで、本研究ではNecdinとSirt1が相互作用する事によって、ニューロンにおけるp53のアセチル化とそれに伴うp53依存性のアポトーシスを抑制するのではないかと考え検討した。

〔方法ならびに成績〕

はじめに免疫組織化学染色によりマウス胎生14.5日目胚の前脳におけるNecdinとSirt1の発現パターンを確認したところ、大脳皮質ニューロンの核および細胞質においてNecdinとSirt1が共局在していた。次に、p53の発現がみとめられないヒト肺癌腫H1299細胞を用い、免疫沈降法によりNecdinとSirt1の結合を確認した。さらに*in vitro*の結合実験により、Sirt1のN末端領域(1-235a.a.)と触媒領域(236-490a.a.)にNecdinが直接結合することが明らかとなった。またこの結合は前脳由来の抽出物を用いた解析においてもみられ、内在性に相互作用する事が示唆された。

次に、NecdinがSirt1を介したp53の脱アセチル化に関与しているか検討した。H1299細胞を用いた過剰発現系と*in vitro* 脱アセチル化検出系により、Necdin存在下においてSirt1のp53脱アセチル化反応は増強した。この時、NecdinはSirt1とp53の相互作用を高め、安定的な三者の複合体を形成した。Necdinが結合する事が出来ないN末端欠損型p53変異体(p53ΔN)を用いた解析では、Sirt1によるp53ΔNの脱アセチル化反応を促進しなかった。したがって、NecdinはSirt1の脱アセチル化活性を直接増強するのではなく、Sirt1とp53の接近性を高める事でp53の脱アセチル化反応を促進する事が示唆された。

Sirt1を介したNecdinのp53脱アセチル化反応の促進現象の生理学的意義を検討するために、Necdin欠損マウス由来の初代大脳皮質ニューロンを用いてp53依存的なアポトーシスへの影響を解析した。p53を介したニューロンのアポトーシスを誘導するために、細胞にDNA損傷を与えるトポソイメラーゼI阻害剤、カンプトテシン(CPT)を用いて検討したところ、Necdin欠損ニューロンではCPTに対する感受性が高く、またアセチル化p53の発現レベルも高かった。この現象は過酸化水素(H₂O₂)処理でもみられた。このNecdin欠損ニューロンにおけるアポトーシスの促進が実際に内在性のp53を介したものであるかを検討するために、RNAiによるp53のノックダウンを行ったところ、Necdinはp53依存性のアポトーシスを特異的に抑制している事が明らかとなった。反対に、Sirt1の活性剤であるリスベラトロール(RSV)によるSirt1の活性促進、RNAiによるSirt1のノックダウンによって、Necdinのp53誘導性のアポトーシスの抑制がSirt1に依存しているかを検討した。野生型ニューロンにおいてはRSV処理に伴いアセチル化p53のレベルとアポトーシスが顕著に減少するが、Necdin欠損ニューロンにおいては変化がみられなかった。このことからSirt1のRSV感受性にはNecdinが必須である事が示唆された。また、RNAiによってSirt1をノックダウンしたところ、野生型ニューロンにおけるアセチル化p53のレベルとアポトーシスの割合が有意に上昇した。これに対してNecdin欠損ニューロンはコントロールのRNAi処理の場合と同様、アセチル化p53のレベルとアポトーシスは高い状態を維持しており、Sirt1 RNAiの影響はみられなかった。よって大脳皮質ニューロンにおけるNecdinはSirt1依存的にp53のアセチル化とp53誘導性のアポトーシスを抑制している事が示唆された。

最後に、*in vivo*におけるNecdin、Sirt1及びp53の局在について検討した。アセチル化p53を検出するために、マウス胎生14.5日目胚前脳のスライス培養を用いた。Necdin欠損マウス由来のスライス培養においてはアセチル化p53のレベルが野生型と比較して有意に高かった。このスライス培養をH₂O₂で処理するとp53が核に集積し、ニューロンの核においてNecdinとSirt1と共局在していた。このことから、Necdin、Sirt1およびp53は*in vivo*においても酸化ストレスに応じて安定的な複合体を形成する事が示唆された。

〔総括〕

本研究により、大脳皮質ニューロンにおいてNecdinはSirt1とp53との安定的な複合体を形成し、Sirt1を介したp53の脱アセチル化反応を促進することによってDNA損傷誘導性のアポトーシスを抑制している事が明らかとなった。これは長期的な生存が必須とされるニューロンにおいて様々な内的、外的ストレスからの防御機構に重要な役割を果たしているものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

ニューロンの分化状態の安定性に重要な役割を果たす多機能性蛋白質Necdinは、ガン抑制遺伝子産物p53に結合し、その転写活性化能やアポトーシス誘導能を抑制する。一方、p53のアセチル化修飾は、転写活性化能を増強してアポトーシスを促進することが知られている。本論文は、Necdinが蛋白質脱アセチル化酵素であるSirtuin1を介して、p53の脱アセチル化に及ぼす影響を検討したものである。Necdinは、Sirtuin1およびp53と安定的な三者複合体を形成し、Sirtuin1によるp53の脱アセチル化を促進した。また、Necdin欠損マウスの大脳皮質由来のニューロンでは、野

生型ニューロンに比べて内在性p53のアセチル化レベルが高く、DNA損傷によるp53依存性アポトーシスも増強されていた。Necdinがニューロンにおける内在性Sirtuin1制御因子として働き、p53のアセチル化状態を制御することを明らかにした本論文の医学上の価値は高く、学位に値するものと認める。