

別紙 1 – 1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第 号
------	-------

氏 名 MILLADO Justine Bennette Hubo

論 文 題 目 Functional analysis of P53 negative regulators in
Bombyx mori

(カイコにおける P53 抑制制御因子の機能解析)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 池田 素子

委 員 名古屋大学教授 浅川 晋

委 員 名古屋大学教授 一柳 健司

委 員 名古屋大学准教授 三浦 健

委 員 名古屋大学助教 浜島 りな

別紙 1 – 2

論文審査の結果の要旨

核多角体病ウイルス (nucleopolyhedrovirus; NPV) は 2 本鎖環状 DNA をゲノムとしてもつ昆虫に特異的なウイルスである。NPV は一般に宿主域が狭いという特徴をもつ。宿主域決定に関わる重要な要素として、昆虫細胞が抗ウイルス応答機構によりウイルスの増殖を阻止していることがあげられる。NPV に感染した昆虫細胞は抗ウイルス応答の一つとしてアポトーシスを誘導するが、その誘導機構は不明である。これまでに、カイコ由来培養細胞（カイコ細胞）において、がん抑制遺伝子 *p53* のカイコ相同体 (*bm-p53*) がカイコ由来の NPV（カイコ NPV）感染におけるアポトーシス誘導に機能していることが示された。哺乳動物の P53 タンパク質は通常、抑制制御因子のはたらきで低いレベルに維持されているが、DNA 損傷など様々なストレス下では翻訳後修飾により安定化し活性化され、アポトーシスを誘導する。そこで本論文では、カイコ NPV 感染細胞におけるアポトーシス誘導機構を明らかにすることを目的として、カイコにおける Bm-P53 の抑制制御因子の同定と機能解析を行った。

まず、哺乳動物とキイロショウジョウバエで報告されている P53 抑制制御因子のカイコ相同遺伝子を探査した。得られた候補遺伝子の機能解析により、哺乳動物 P53 の主要な抑制制御因子である Mdm2 のカイコ相同体 (Bm-Mdm2) が Bm-P53 の抑制制御因子として機能することを明らかにした。つぎに、Bm-Mdm2 の部分欠損体を用いて機能解析を行い、今回欠損させたいずれの領域も Bm-P53 の抑制制御に必須であることを示した。続いて、カイコ NPV 感染が Bm-Mdm2 の発現におよぼす影響を調査し、カイコ NPV の初期遺伝子発現から DNA 複製が開始するまでの感染段階で、*bm-mdm2* の転写レベルの減少とは対照的に Bm-Mdm2 タンパク質の蓄積の増加が誘導されることを明らかにした。

1. カイコ P53 制御因子をコードする遺伝子のクローニングと性状

哺乳動物とキイロショウジョウバエが共通して持つ P53 抑制制御因子のカイコ相同遺伝子として、*bm-bonus*, *bm-rad6*, *bm-sce*, *bm-synoviolin* を同定した。さらに、哺乳動物 *mdm2* の相同遺伝子 *bm-mdm2* を同定した。キイロショウジョウバエは *mdm2* を持たず、機能的の相同遺伝子として *corp* を持つ。一方、カイコは *corp* の相同遺伝子を持っていなかった。得られたカイコ相同遺伝子の一過性発現とノックダウン解析によって、Bm-Mdm2 が Bm-P53 の主要な抑制制御因子として機能していることを明らかにした。Bm-Mdm2 には哺乳動物 Mdm2 と共通の酸性領域(AR)様のドメイン、ジンクフィンガードメイン (Zn-F), リングドメイン (RING) が存在したが、哺乳動物 Mdm2 の N 末端側に存在する P53 結合ドメイン (p53-BD) が欠損していた。それにもかかわらず、Bm-Mdm2 は Bm-P53 によって誘導されるアポトーシスを阻害した。Bm-Mdm2 による Bm-P53 の阻害は、ユビキチン-プロテアソーム系を介して行われていることを示唆した。Bm-Mdm2 の細胞内局在性を調

別紙 1 – 2

論文審査の結果の要旨

査した結果、核小体に局在することがわかった。哺乳動物 Mdm2 は核と細胞質に局在し、P53 のユビキチン化と核外移行によりプロテアソームによる分解を促進する。したがって、Bm-Mdm2 は哺乳動物とは異なる機構によって Bm-P53 を抑制していることが示唆された。

2. Bm-Mdm2 による Bm-P53 の制御機構

カイコを含む昆虫および哺乳動物の Mdm2 を用いたモチーフ解析から、Bm-Mdm2 は 5 つのモチーフ (M1, M2, M3, M5, M6) を保有することが示された。そこで、モチーフの位置に基づき部分欠損体を 3 種類作成し、カイコ細胞における一過性発現解析を行った。しかし、いずれの欠損体も Bm-P53 をユビキチン化する活性と Bm-P53 により誘導されるアポトーシスを抑制する活性を示さなかった。部分欠損体の細胞内局在性の調査から、C 末端側の M1 モチーフには Bm-Mdm2 の核小体への局在シグナルが存在することが示された。哺乳動物 Mdm2 は P53 の C 末端側にある複数のリジン残基をユビキチン化し、P53 の核外移行とプロテアソームによる分解を促進している。Bm-P53 の C 末端側には哺乳動物 P53 と相同なドメインが認められることから、Bm-P53 の C 末端領域欠損体を作成し、Bm-Mdm2 と共に発現させた。その結果、細胞にアポトーシスが誘導されたことから、Bm-Mdm2 は Bm-P53 の C 末端領域と相互作用していることが示された。

3. カイコ NPV 感染に対する Bm-Mdm2 の応答現象

カイコ NPV 感染にともない内在性の *bm-mdm2* の mRNA 量は減少した。一方、内在性 Bm-Mdm2 タンパク質の蓄積は感染後 24 時間まで増加し、その後分解減少した。Bm-Mdm2 タンパク質の蓄積の増加は、カイコ NPV 感染の初期からウイルス DNA 複製までの間に誘導されたことがわかった。一方、Bm-P53 の蓄積は感染を通して変動しないこと、さらに一過性発現させた Bm-Mdm2 はカイコ NPV 感染に影響しなかったことから、NPV 感染における Bm-Mdm2 の役割については解明に至らなかった。

以上のように、MILLADO Justine Bennette Hubo は、昆虫において Mdm2 が P53 の主要な抑制制御因子として機能することを初めて明らかにし、さらにその抑制機構が哺乳動物の Mdm2 とは異なることを示唆した。また、カイコ NPV 感染細胞においても Bm-Mdm2 は特異な制御を受けていることを示した。これらの成果は、NPV の宿主域決定機構についての重要な知見として貢献するだけでなく、がん抑制タンパク質 P53 の新たな制御機構の提案につながることが期待される。

学位審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位を授与するに十分な価値を有するものと認め、博士論文として合格と判定した。