

氏名	トーマス クビン		
授与した学位	博	士	
専攻分野の名称	学	術	
学位授与番号	博 甲 第 1258 号		
学位授与の日付	平成 6 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	自然科学研究科生体調節科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文題目	The role of the tumor suppressor gene p53 and mdm2 protooncogene in liver necrosis and regeneration, and their involvement in apoptosis of thymocytes (肝臓の障害、再生および胸腺細胞のアポトーシスにおける p53 癌抑制遺伝子と mdm2 protooncogene の役割)		
論文審査委員	教授 山本 格	教授 田坂 賢二	教授 早津 彦哉
	教授 中島 利勝	教授 丹羽 皓二	

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

最近、p53癌抑制遺伝子の異常が、ほとんどすべてのヒト腫瘍で高頻度に存在することが相次いで報告されている。正常p53は四量体を形成し転写因子として機能しており、これに結合するタンパク質の一つとしてMDM2が同定された。MDM2はp53タンパク質と結合することにより、p53タンパク質の機能を抑制していると考えられているが、詳細については明らかではない。現在、このMDM2の機能を解明することが大きなテーマの一つになっている。本研究で私は、MDM2がnecrosisやapoptosisのような細胞死に関係があることを明らかにした。まず、Northern blottingで用いるmbm2及びp53癌抑制遺伝子 probeをラットの初代培養肝細胞抽出液からRT-PCR、続いてクローニングすることによって得た。これらはシーケンシングを行い、目的とするDNA断片が挿入されていることを確認した。肝mdm2mRNAレベルが、肝毒性を示す四塩化炭素をラットに経口投与すると、肝障害に先行して用量依存的に顕著に増加した。しかし、70%肝切除によっては、mdm2 mRNAレベルにはほとんど変化が認められなかった。一方、肝p53 mRNAレベルは四塩化炭素投与群でも部分肝切除群でも上昇した。四塩化炭素投与群におけるmdm2 mRNAのピークはp53 mRNAレベルのそれと同様に、週令には関係なく投与後約12時間

であり、また、c-myc mRNA レベルのピークよりも遅いものであった。また、培養胸腺細胞に放射線を照射することによって apoptosis を誘導すると、mdm2 mRNA レベルが増加した。

以上の結果より、細胞死の初期段階における mdm2 の一過性で著しい誘導は、続いて起こる再生や細胞増殖よりもむしろ necrosis あるいは apoptosis に関係があること、さらには肝障害の指標遺伝子として mdm2 が応用できる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

p53 癌抑制遺伝子の機能は多様であるが、特に細胞増殖やプログラム細胞死（アポトーシス）の制御に重要であると考えられている。通常、p53 は四量体を形成し、転写因子として働いているが、最近これに結合するタンパク質の一つとして MDM2 が同定された。MDM2 は p53 に結合し、その機能を抑制することが知られているがその詳細は不明である。本論文で、申請者は肝臓の増殖（proliferation）や壊死（necrosis）過程における mdm2 及び p53 両遺伝子の発現について調べ、mdm2 の発現が肝細胞壊死に先行して誘導されることを見出した。さらには、mdm2 発現が胸腺細胞の apoptosis の際にも誘導されることを明らかにし、mdm2 は増殖過程よりもむしろ、細胞死の過程に関与している可能性を示唆した。すなわち、申請者はまず、ラット初代培養肝細胞の total RNA から RT-PCR、これに続くクローニングにより、mdm2 cDNA probe を作製し、シーケンシングを行い、目的とする DNA 断片が挿入されていることを確認した。このものと、既存の方法で作製した p53 cDNA probe を Northern blotting に用いて以下の結果を得た。肝毒性を惹起する四塩化炭素をラットに経口投与したところ用量依存的に、肝 mdm2 mRNA レベルが肝障害に先行（ピークは投与後約 12 時間）して顕著に増加することを見出した。しかし、70% 肝切除ではこのような現象は観察されなかった。なお、ラット mdm2 mRNA は 3.3 kb と 1.8 kb の位置に認められ、その大きさはマウスのそれとほぼ同一であることを明らかにした。一方、肝 p53 mRNA レベルは、四塩化炭素投与、並びに部分肝切除の両者で、その上昇が認められ、mdm2 との相違点が示された。p53 mRNA レベルのピークは処理後 12 時間で、c-myc mRNA（4 時間）よりも遅いものであった。なお、ラット p53 mRNA はマウスの 1.8 kb に比べ少し大きく 2.0 kb の位置に認められることを明らかにした。また、培養胸腺細胞に放射線を照射することによって apoptosis を誘導すると、mdm2 mRNA レベルが上昇することを示した。このように本論文は mdm2 が細胞死の初期段階において一過性に誘導されることから、mdm2 は続いて起こる再生や細胞増殖よりもむしろ necrosis あるいは apoptosis に関係があることを示唆し、さらには肝障害の指標遺伝子として mdm2 が応用できる可能性を示したものである。以上、本研究は mdm2 の新たな機能を発見したものであり、学術上高く評価することができる。よって、本論文は博士学位論

文に値するものと認定した。