

氏名(本籍)	ニシャント サクセーナ (インド)
学位の種類	博士(環境学)
学位記番号	博甲第6156号
学位授与年月日	平成24年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	<b>Molecular Functions of Mortalin in Cellular Senescence, Cancer and Environmental Stress Management</b> (細胞老化、ガンと環境ストレス制御におけるモータリンの分子機能)

主査	筑波大学教授	理学博士	石井哲郎
副査	筑波大学教授	理学博士	野本信也
副査	筑波大学教授	博士(医学)	土屋尚之
副査	筑波大学講師	博士(農学)	藤栄治
副査	筑波大学助教	博士(医学)	新開泰弘

## 論文の内容の要旨

### (目的)

ヒートショックタンパク質 Hsp70 ファミリーに属するモータリンは、正常型 p53 に細胞質で結合して不活性化し、ガン細胞のアポトーシスの制御に関与している。一方、誘導タンパク質であるモータリンは、ストレス、細胞の老化、アポトーシス、ガン化などに関連してその発現レベルと局在が変化するタンパク質である。本研究では、二つの課題、すなわちモータリンの誘導を用いた水質汚染の検出方法の検討とモータリンの細胞アポトーシスシグナル系における役割について、前者は水生動物メダカを用い、後者は培養細胞を用いてアポトーシスシグナル系の他のタンパク質との結合様式について研究した。

### (対象と方法)

課題1についてはメダカ (*Oryzias latipes*) を用いた。飼育水を比較したり、化学物質を飼育水に加えてメダカ個体におけるモータリンの発現レベルをウエスタンブロットにより検出した。課題2については、モータリンを高発現しているガン細胞 U2OS を用いて、発現ベクターをトランスフェクトし Bcl-xL と Bcl-2 をそれぞれ高発現させた。細胞免疫染色と免疫沈降法によりモータリンと Bcl-xL と Bcl-2 タンパク質との結合を調べた。さらにこれらの部分欠損タンパク質を発現させて、モータリンと結合するドメイン解析を行なった。

### (結果)

各種の水で飼育後、メダカ全身から分離したタンパク質試料におけるモータリン量についてウエスタンブロット法で検出するモータリン抗体を評価し選別した。水道水で飼育したメダカを対照とし、つくば近郊で採取した水で飼育したメダカとモータリンの発現状態を比較したところ、水質汚染状況によるとみられる発現レベルのばらつきを検出した。さらに、硫酸カドミウム、塩化ニッケル、酸化ヒ素、過酸化水素を含む水道水で飼育したメダカも比較検討した。その結果、硫酸カドミウムと塩化ニッケルによるメダカ個体でのモータリンの発現誘導を見いだした。

モータリンと Bcl-xL と Bcl-2 タンパク質との結合を免疫染色と免疫沈降法により確認した。このとき、

Bcl-xL と Bcl-2 タンパク質の高発現により、細胞内では p53 の発現が増加し、逆にモータリンが低下した。このことは、Bcl-xL と Bcl-2 タンパク質の高発現により、モータリンと p53 の結合が干渉を受けている可能性がある。Bcl-xL と Bcl-2 タンパク質のドメイン解析から、モータリンに結合する領域を推定した。Bcl-xL と Bcl-2 タンパク質の高発現により、ガン細胞のコロニー形成能が低下し、老化した細胞が増えることを見だし、ガン細胞の形質が変化することを証明した。

#### (考察)

カドミウム、ニッケル、ヒ素などは環境汚染物質として知られ、これらによる河川、湖水や井水の汚濁は種々の疾患を引き起こすことが知られている。熱ショックタンパク質 (Heat Shock Proteins, HSP) は、温度、化学物質、重金属、食物、放射線など様々なストレス状態に反応して発現が誘導されるタンパク質群のひとつであり、それらは感度の良いストレスバイオマーカーの役目を果たす。本研究は、HSP70 に属するモータリンがメダカ個体で誘導される事を初めて示し、生物を用いた環境汚染検出の高感度マーカーとして利用しうる事を示唆した。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

ガン細胞におけるモータリンと p53 との相互作用に加えて、Bcl-xL と Bcl-2 タンパク質が p53 と拮抗してモータリンに結合する事を示した成果は、ガン細胞の制御の視点からも興味深く高く評価できる。また、抗アポトーシス因子である Bcl-xL と Bcl-2 タンパク質は、モータリンと相互作用し、アポトーシスを誘導する p53 の発現量を増加させる作用は興味深い。モータリンの作用を抑制することで、ガン細胞の形質が変化し、悪性度が低下する作用を示したことは、モータリンのアポトーシスシグナルへの新しい関与を示しており、今後の研究の発展が楽しみである。

平成 24 年 1 月 16 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (環境学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。