氏　　　　名　石（いし）　田（だ）　　剛（たけし）
学位(専攻分野)　博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号　医　博　第3071号
学位授与の日付　平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件　学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻　医学研究科病理系専攻

学位論文題目　The expression of phosphatidic acid phosphatase 2a, which hydrolyzes lipids to generate diacylglycerol, is regulated by p73, a member of the p53 family
（脂質をジアシルグリセロールに変換するホスファチジン酸ホスファターゼ2aの発現はp53ファミリー分子のひとつであるp73によって制御されている）

論文調査委員　（主　査）教 授 武 藤　誠　教 授 野 田　亮　教 授 鍋 島 陽 一

## 論　文　内　容　の　要　旨

癌抑制遺伝子であるp53は正常な細胞増殖の維持に重要な役割を担っているのに対して，p53関連遺伝子であるp73は動物の発生，特に神経発生において重要な役割を担っていると考えられている。転写因子として機能するp53によってその発現が誘導される，所謂p53の標的遺伝子に関しては，これまでに数多く同定されているのに対して，p73の標的遺伝子はごく少数にとどまっている。そのため，p73の生理学的機能は未だに不明な点が多い。p73の生理学的役割を解明するためにはp73の特異的な標的遺伝子を同定することが必要である。そこで，以下の実験を行い，p73特異的な標的遺伝子の探索を行った。まず，p53，或いはp73を組み込んだアデノウイルスベクターをSaos-2細胞に感染させてそれぞれのタンパク質を発現させた。各細胞から抽出したmRNAを用いて，SAGE（serial analysis of gene expression）法による遺伝子発現の比較解析をおこない，p73を発現したSaos-2細胞特異的に発現量が上昇しているmRNA種の候補を選択した。各候補mRNAに関してノーザンブロット法によるmRNAの定量解析をおこない，p73発現細胞で特異的にmRNAの発現量が上昇している遺伝子を検証した。その結果，脂質を加水分解しdiacylglycerolを作り出す働きのあるホスファチド酸ホスファターゼ2a（PAP2a）遺伝子を同定した。またPAP2a特異的抗体を作成し，ウェスタンブロット法による解析をおこない，このp73発現により内在性PAP2aタンパク質量が増加するという結果を得た。このp73によるPAP2aのmRNA量およびタンパク質量の増加が，p73によるPAP2a遺伝子発現の誘導によるものであるか否かを検討するため，PAP2a遺伝子転写プロモーター領域を用いたレポーターアッセイをおこなった。まずヒト白血球細胞からヒトPAP2a遺伝子の5′上流領域の約16kb長にわたる領域を4分割してクローニングし，ホタルルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として持つレポータープラスミドを作成した。また，そのレポータープラスミド中の5′上流領域に関する各種欠失変異体を作成し，レポーターアッセイに用いた。その結果，PAP2a遺伝子5′上流領域の中にp73発現特異的にレポーター活性を上昇させる領域を見いだした。しかしながら，このレポーター遺伝子発現の活性化はp53の発現では認められなかった。さらに，この領域を組み込んだプラスミドを用いてDNA-protein immunoprecipitation assayをおこない，p73が実際にこの領域に結合する活性を有することを認めた。以上の結果から，p73はPAP2a遺伝子の転写プロモーター領域に結合してPAP2a遺伝子発現を直接誘導することが示唆された。このことからPAP2a遺伝子が新規のp73特異的標的遺伝子であると考えられた。PAP2aによる脂質の加水分解によって，プロテインキナーゼC（PKC）の活性化に機能するdiacylglycerolが産生されることから，p73はPAP2aの発現制御を介してPKCが関与する細胞内シグナル伝達系を修飾する可能性が考えられた。これらの結果は，これまで不明であったp73の機能の一端を示すものであり，今後p73の生理学的役割の詳細を明らかにするために有用な情報になると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

癌抑制遺伝子 p53 の関連遺伝子である p73 は動物の発生，特に神経発生において重要な役割を担っていると考えられている。しかしながら p73 の標的遺伝子はこれまで少数しかあきらかにされていないため，その生理的機能の分子レベルでの理解には不明な点が多い。そこで，本研究において申請者は p73 の生理学的役割を解明するために p73 特異的な標的遺伝子の探索をおこなった。p53，或いは p73 を発現させた細胞から RNA を回収し，Serial，Analysis of Gene Expression（SAGE）という手法を用いて遺伝子の発現プロファイルを調べた。その結果，脂質を加水分解し diacylglycerol を作り出す働きのあるホスファチド酸ホスファターゼ 2a（PAP2a）遺伝子の mRNA 量が p73 の発現により特異的に増加することを見いだした。更に，PAP2a 遺伝子のプロモーターをクローニングして解析し，その中に p73が結合して p73 発現特異的にレポーター活性を上昇させる領域があることを明らかにした。以上のごとから，p73 は PAP2a 遺伝子のプロモーター領域に結合して PAP2a 遺伝子発現を直接誘導することが示唆され，PAP2a 遺伝子が p73 特異的な新規標的遺伝子であると考えられた。

以上の研究は p73 の生理学的機能の解明に貢献し，動物の発生機構の研究に寄与するところが多い。

したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。なお，本学位授与申請者は，平成19年２月１日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け，合格と認められたものである。