

氏 名	いし だ たけし 石 田 剛
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 特異的な抗体を作成し、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 特異的な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。