

氏 名	うえ だ よし ひで 上 田 佳 秀
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2344 号
学位授与の日付	平 成 13 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	New p73 variants with altered C-terminal structures have varied transcriptional activities (異なる C 末端構造をもつ新しい p73 バリエントは異なる転写活性化能を有する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 藤 嘉 明 教 授 野 田 亮 教 授 下 遠 野 邦 忠

論 文 内 容 の 要 旨

p73 は癌抑制遺伝子 p53 と高い相同性をもつタンパク質として同定されたが、その機能については不明な点が多い。p73 と p53 との構造上の最も大きな相違点は、p73 のもつ長い C 末端領域にある。我々は、この C 末端領域の異なるスプライシングバリエントを新たに同定し、それらの機能を解析することにより、p73 の機能を明らかにすることを目的とした。

培養細胞 MCF-7 より抽出した mRNA より RT-PCR にて p73 cDNA のサブクローニングを行った際に、以前に報告されていた p73 α , β とは別の新しいスプライシングバリエントを 2 種類同定し、それぞれ p73 γ , ϵ と名付けた。シーケンス解析により、p73 α cDNA と比較して、p73 γ はエクソン 11 を、p73 ϵ はエクソン 11 と 13 を欠いたスプライシングバリエントであることが明らかとなった。p73 β はエクソン 13 を欠いているスプライシングバリエントとして報告されており、p73 は少なくとも 4 種類の C 末端構造が異なるタンパク質を産生することが推定された。これらのスプライシングバリエントの存在を確認し、その発現パターンについて検討するため、RT-PCR-Southern blotting を用いて、培養細胞ならびにヒト正常組織における mRNA の発現比率を半定量的に解析した。その結果、ヒト正常組織にて p73 α , β , γ , ϵ に相当する 4 種類の mRNA の発現が認められ、さらに、培養細胞間ならびに各臓器間でその発現比率に相違が認められた。ヒトの 12 臓器の検討では、脳、肺、精巣、胸腺において p73 の高い発現を認めた。精巣においてはスプライシングバリエントの発現比率が他臓器と異なるパターンを示し、p73 β の発現が非常に少ないのに対して p73 γ の発現は増加していた。

次に、p73 が alternative splicing によってその機能を制御している可能性を考え、これらスプライシングバリエントの p53 結合配列を含む転写プロモーターに対する転写活性化能について検討した。真核細胞用発現プラスミドに各スプライシングバリエントならびにその欠失変異株の cDNA を挿入して各タンパク質の発現プラスミドを作製し、それらを p53 結合配列を含むプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を配置したレポータープラスミドと共に培養細胞に導入してその転写活性を解析した。その結果、すべてのスプライシングバリエントが転写活性化能を有していたが、その程度に差を認めた。p73 β では p53 と同程度の強い活性を認めたのに対し、p73 α , γ , ϵ の活性は p53 と比較して非常に弱いことが明らかとなった。さらに、野生型の p53 を発現している HepG2 細胞や MCF-7 細胞において p73 α , γ , ϵ を発現させた場合には、それらは内在性の p53 活性に対して抑制的に作用することが明らかとなった。この抑制的作用は DNA 結合能を欠いていると考えられる欠失変異株では認められなかったため、p53 結合配列に対して、p73 と p53 が競合的に結合することが推定された。

以上より、p73 には C 末端領域の異なる少なくとも 4 種のスプライシングバリエントが存在し、それらの発現比率は培養細胞間ならびに臓器間で異なること、またそれらのバリエントは p53 結合配列を含む転写プロモーターに対し、異なる転写活性化能を有することが明らかとなった。さらに、一部の p73 バリエントは p53 の転写活性化能に対して抑制的に作用した。これらの結果より、p73 は alternative splicing によってその機能を制御している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

p73 は癌抑制遺伝子 p53 と高い相同性をもつタンパク質、として同定されたが、その機能については不明な点が多い。

本研究ではまず、以前に報告されていた p73 α , β とは別の新しいスプライシングバリエントである p73 γ , ϵ を同定した。このことより、p73 は少なくとも 4 種類の C 末端構造が異なるタンパク質を産生することが推定された。培養細胞ならびにヒト正常組織における mRNA の発現比率を半定量的に解析した結果、ヒト正常組織にて p73 α , β , γ , ϵ に相当する 4 種類の mRNA の発現が認められ、さらに、培養細胞間ならびに各臓器間でその発現比率に相違が認められた。

次に、これらスプライシングバリエントの p53 結合配列を含む転写プロモーターに対する転写活性化能について検討を行った。その結果、すべてのスプライシングバリエントが転写活性化能を有していたが、その程度に差を認めた。p73 β では p53 と同程度の強い活性を認めたのに対し、p73 α , γ , ϵ の活性は p53 と比較して非常に弱いことが明らかとなった。さらに、野生型の p53 を発現している HepG2 細胞や MCF-7 細胞において p73 α , γ , ϵ を発現させた場合には、それらは内在性の p53 活性に対して抑制的に作用することが明らかとなった。

以上の結果より、p73 は alternative splicing によってその機能を制御している可能性が示唆された。

以上の研究は、p73 の機能の解明に貢献し、腫瘍学、発生学に寄与するところが多い。従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成13年2月7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。