氏名（本籍）　大西（おおにし）素子（もとこ）

学位の種類　博士（医学）

学位記番号　医博第1280号

学位授与年月日　平成8年3月26日

学位授与の条件　学位規則第4条第1項該当

研究科専攻　東北大学大学院医学系研究科
（博士課程）生理学系専攻

学位論文題目　マウスプロテインセリン/トレオニンホスファターゼ2Cβ遺伝子の発現調節機構の解析

（主査）
論文審査委員　教授　田村眞理　教授　林　典夫

教授　岡本　宏

論 文 内 容 要 旨

細胞内の多くのシグナル伝達系は，タンパク質のリン酸化，脱リン酸化のバランスによって制御されている。プロテインセリン/トレオニンホスファターゼは，酵素学的にPP1，PP2A，PP2BおよびPP2Cの四種類に分類されている。それぞれのホスファターゼの活性サブユニットは異なった遺伝子の産物である。このうちPP2Cは，αとβの2種類のアイソタイプが存在することが知られていたが，cDNAがクローニングされた結果，αとβは異なった遺伝子にコードされていることが明らかとなった。さらに，βにはC末端の十数アミノ酸のみがことなる，β-1からβ-5までの5種類のアイソフォームが存在し，これらは選択的スプライシングの産物であることが示唆されている。PP2Cβのm RNAの発現はマウスの各臓器に遍在するものの，精巣で著しく高いこと，および精巣の成熟に伴って，PP2Cβの5種類のアイソフォームのうち，β-3，-4，および-5の発現が急激に増加することから，PP2Cβ遺伝子には，臓器特異的かつ細胞分化に依存した，発現制御機構が存在することが強く示唆された。本研究では，このようなPP2Cβ遺伝子の発現調節機構を解明することを目的として，PP2CβゲノムDNAのクローニングと転写調節領域の解析を行い，さらにPP2Cβの機能を探索する目的で，PP2Cβ遺伝子の突然変異に起因する既知の変異マウスや遺伝病の有無を調べるために，遺伝子座を決定した。まず，PP2Cβ遺伝子のクローニングを行ったところ，2種類の遺伝子を含む，複数の重複するクローンが単離され，一方の遺伝子は，イントロンを持たない，偽遺伝子であることが明らかになった。もう一方の遺伝子を含むクローンを解析することによって，PP2Cβ遺伝子のエクソン1およびエクソン2の構造を明らかにした。次にプロモーター領域の解析を行うため，まずプライマー伸長法によって転写開始点を決定した結果，主な転写開始点は一カ所であった。転写開始点上流601bpにTATA boxは無く，3カ所のGC boxが存在し，通常と異なる位置に3カ所のCAAT boxが認められるなど，ハウスキーピングタイプの遺伝子の特徴を持っていた。上流約2.1kbpをルシフェラーゼレポータープラスミドにつなぎ，P19 EC細胞に導入して活性を測定した結果，高いプロモーター活性が得られた。さらに様々な長さの欠損プラスミドを用いた活性測定の結果から，−493から−439までの領域が活性の発現に必須であることがわかった。この領域の配列に相当する，互いに重複する3種類のプローブを作成し，P19細胞の核抽出液と混合して，ゲルシフトアッセイを行ったところ，核内因子が結合することが示唆された。3種類のプローブのいずれをコンペティターとして用いたときも，シグナルが消失するので，核内因子の結合には，これら3種類のプローブの重複する領域が重要である可能性が示唆された。この領域は転写因子のengrailedやYY1が結合するコンセンサス配列を含んでいた。この遺伝子に特異的なプローブを

用い，FISH法によってマッピングを行ったところ，PP2Cβの遺伝子座は17E4-5であった。さらに遺伝子連鎖法によって，遺伝子マーカーや近傍の遺伝子との位置関係を決定し，ヒトの遺伝子とのシンテニーからヒトでは2p21-23にマッピングされる可能性を示した。

審 査 結 果 の 要 旨

細胞内の多くのシグナル伝達系は，タンパク質のリン酸化，脱リン酸化のバランスによって制御されている。プロテインセリン/トレオニンホスファターゼは，酵素学的に PP1，PP2A，PP2B および PP2C の四種類に分類されている。それぞれのホスファターゼの活性サブユニットは異なった遺伝子の産物である。このうち PP2C は，αとβの 2 種類のアイソタイプが存在することが知られていたが，cDNA がクローニングされた結果，αとβは異なった遺伝子にコードされていることが明らかとなった。さらに，βにはＣ末端の十数アミノ酸のみがことなる，β-1 からβ-5 までの 5 種類のアイソフォームが存在し，これらは選択的スプライシングの産物であることが明らかにされている。PP2Cβの mRNA の発現はマウスの各臓器に偏在するものの，精巣で著しく高いこと，および精巣の成熟に伴って，PP2Cβの 5 種類のアイソフォームのうち，β-3，-4，および -5 の発現が急激に増加することから，PP2Cβ遺伝子には，臓器特異的かつ細胞分化に依存した，発現制御機構が存在することが強く示唆された。本研究で著者は，このような PP2Cβ遺伝子の発現調節機構を解明することを目的として，PP2Cβゲノム DNA のクローニングと転写調節領域の解析を行い，さらに PP2Cβの機能を探索する目的で，PP2Cβ遺伝子の突然変異に起因する既知の変異マウスや遺伝病の有無を調べるために，遺伝子座を決定した。まず，PP2Cβ遺伝子のクローニングを行ったところ，2 種類の遺伝子を含む，複数の重複するクローンが単離され，一方の遺伝子は，イントロンを持たない，偽遺伝子であることが明らかになった。もう一方の遺伝子を含むクローンを解析することによって，PP2Cβ遺伝子のエクソン 1 およびエクソン 2 の構造を明らかにした。次にプロモーター領域の解析を行うため，まずプライマー伸長法によって転写開始点を決定した結果，主な転写開始点は一カ所であった。転写開始点上流 601bp に TATA box は無く，3 カ所の GC box が存在し，通常と異なる位置に 3 カ所の CAAT box が認められるなど，ハウスキーピングタイプの遺伝子の特徴を持っていた。上流約 2.1kbp をルシフェラーゼレポータープラスミドにつなぎ，P19EC 細胞に導入して活性を測定した結果，高いプロモーター活性が得られた。さらに様々な長さの欠損プラスミドを用いた活性測定の結果から，−493 から−439 までの領域が活性の発現に必須であることがわかった。この領域の配列に相当する，互いに重複する 3 種類のプローブを作成し，P19 細胞の核抽出液と混合して，ゲルシフトアッセイを行ったところ，核内因子が結合することが示唆された。3 種類のプローブのいずれをコンペティターとして用いたときも，シグナルが消失するので，核内因子の結合には，これら三種類のプローブの重複する領域が重要である可能性が示唆された。この領域は転写因子の engrailed や YY1 が結合するコンセンサス配列を含んでいた。この遺伝子に特異的なプローブを用い，FISH 法によってマッピングを行ったところ，PP2Cβの遺伝子座は 17E4-5 であった。さらに遺伝子連鎖法によって，遺伝子マーカーや近傍の遺伝子との位置関係を決定し，ヒトの遺伝子とのシンテニーからヒトでは 2p21-23 にマッピングされる可能性を示した。

本研究は，これまで不明であった，PP2Cβ遺伝子の構造と発現制御機構解明の端緒となる，重要な研究であり，学位授与に相応しい内容であると判定する。