

審査の結果の要旨

氏名 伊豆津 宏二

EVI-1 遺伝子は、ヒト染色体 3q26 に位置しており、この部位には骨髄異形成症候群や、骨髄性白血病の症例においてしばしば転座や逆位などの染色体異常が認められる。これらの染色体異常によって、また、染色体異常がない場合においてもしばしばヒトの骨髄性腫瘍では *EVI-1* 遺伝子の過剰発現がみられることから、*EVI-1* がヒトの白血病の発症に関与していることが考えられている。近年、*EVI-1* 蛋白は、TGF- β シグナルを細胞内で伝達する Smad3 と結合して、Smad 蛋白による転写活性化能を抑制することが知られるようになった。TGF- β シグナルは血液細胞に対して、増殖抑制・分化促進的に働くことが知られており、そのシグナル伝達の抑制は、*Evi-1* による白血病化の機序を説明する上で非常に興味深い。申請者の研究は、*Evi-1* による Smad3 抑制の機序について解明し、コリプレッサー蛋白 CtBP の関与を明らかにしたものである。

- 1 HepG2 細胞に TGF- β によって転写活性化がみられる、p3TP-Lux レポーターを導入し、レポーターアッセイを行った。この細胞に野生型 *Evi-1* を導入すると、TGF- β による転写活性化能が抑制される。しかし、544-607 番アミノ酸領域を欠失させた変異 *Evi-1* においては、この抑制能が著明に減弱していた。よって、*Evi-1* の 544-607 番アミノ酸領域(*Evi-1*(544-607))が転写抑制にとって重要であることが明らかとなった。
- 2 *Evi-1*(544-607)には、コリプレッサー蛋白として知られる CtBP が結合することが知られているアミノ酸配列、PXDLT/S が 2 つ存在している。その為、申請者は、*Evi-1* と CtBP の関係について研究を進めた。*Evi-1*、CtBP を強制発現させた COS7 細胞を用いた、免疫沈降実験によって、*Evi-1* がアミノ酸 544-607 番領域を介して CtBP が細胞内で結合することを明らかにした。また、2 つの CtBP 結合様配列(PFDLT, PLDLS)のうち、C 末端側の PLDLS 配列のみがこの結合に

関与していることを明らかにした。

- 3 CtBP の側の結合責任領域を求める為、CtBP の各部分と GST との融合蛋白を Evi-1 と同時に COS7 細胞に発現させ、プルダウン実験を行うことにより、CtBP の全領域が Evi-1 との結合に関与していることを明らかにした。
- 4 前述のレポーターアッセイを、CtBP と結合できない Evi-1 変異体(PLASS)を用いて行い、Evi-1 の転写抑制能が著明に減弱していることを示した。これにより、申請者は Evi-1 による転写抑制には CtBP との結合が必要であることを明らかにした。
- 5 CtBP は、ヒストン脱アセチル化酵素 1(HDAC1)と結合することが知られている。申請者は、HepG2 細胞に p3TP-Lux を導入したレポーターアッセイを、HDAC 酵素阻害剤である、トリコスタチンの存在下に行うことによって、Evi-1 による転写抑制に CtBP と HDAC の複合体が関与していることを明らかにした。
- 6 ミンク肺上皮細胞 Mv1Lu 細胞は、TGF- β に反応して増殖抑制がみられるが、これに Evi-1 を導入した細胞では、TGF- β 反応性が低下するため増殖抑制が鈍化する。CtBP と結合できない変異 Evi-1 を導入した Mv1Lu 細胞を用いて増殖実験を行うことによって、この場合においても、CtBP との結合が必要であることを示した。

以上、申請者の研究は、Evi-1 による転写抑制機構における、CtBP、ヒストン脱アセチル化酵素の役割を示したものである。このことは、Evi-1 によっておこる骨髄性腫瘍の治療を考える上でも意義深いものであると考えられる。すなわち、Evi-1 自体を治療標的にすることができない場合、コリプレッサーである、CtBP、HDAC を標的とした治療の可能性に道を開くものである。その点でも、今後の発展が期待できると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。