

審査の結果の要旨

氏名 ラン アン グエン

Lan Anh Nguyen

本研究は、生体型造血に必須であり白血病発症に重要であることが示されている転写因子 AML1 の機能を明らかにするため、AML1 複合体を精製することにより AML1 と相互作用して機能する因子を同定し、その機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マウス骨髄性細胞株 L-G に FLAG タグ付きの AML1 を発現させ、これらの細胞抽出液から AML1 複合体をアフィニティー精製した。AML1 複合体画分にはコントロール画分には含まれない特異的なポリペプチドがいくつか含まれていた。そこでこれらを切り出してトリプシン消化後、2次元質量分析を行ったところ、約 120kD のポリペプチドにはマウス PML 蛋白質に見られる4つのペプチド断片が同定された。この結果から、PML が AML1 複合体に含まれることが強く示唆された。
2. PML I 蛋白質にはスプライシングの違いにより多くのアイソフォームが存在するが、このうち核に存在する主要なアイソフォーム I-VI を AML1 と細胞に共発現して、IP-ウエスタン解析により AML1 と PML の各アイソフォームとの結合を調べた。その結果 PML I だけが AML1 と共沈殿することから、AML1b は PML I 特異的に結合することが明らかになった。この結果は AML1b 複合体に含まれていたポリペプチドの分子量が PML I と良く一致することや2次元質量分析で同定されたペプチド断片に PML I 特異的なものが含まれていたことから支持される。
3. PML I と AML1b の様々な欠失変異体を用いてそれぞれの結合に必要な領域を同定した。PML I のアミノ酸 591-843 のC末端領域が AML1 との結合に必要であり、AML1b のアミノ酸 362-402 の領域が PML I との結合に必要であることが示された。AML1b の核マトリックス局在シグナル (アミノ酸 351-381) はこの PML 結合領域と重なることから、PML I との結合が AML1 の核マトリックスへの局在に重要であることが示唆された。
4. PML は核体 (NB) と呼ばれる斑点状の核内構造の主要な構成因子であり、p300/CBP などいくつかの蛋白質が PML と結合してこの構造体に局在し得ることが知られている。そこで、AML1b とその転写共役因子である p300 を PML I と共に Saos-2 細胞

に発現して、これらの局在を調べた。AML1b 及び p300 は PML I を共発現させないときには核内にほぼ一様に局在するのに対して、PML I を共発現したときには両者は共に斑点状の NB に局在することが示された。これらの結果から、PML I は AML1b と p300 を NB に共局在させ、両者の会合を促進する可能性が示唆された。

5. AML1 は L-G 細胞の分化を促進することから、この細胞系における PML I の分化増殖への影響について検討した。レトロウイルスベクターを用いて PML I を L-G 細胞に発現させたところ、G-CSF 存在下での増殖が抑制され、分化が促進された。いくつかの変異体を用いて同様に試験したところ、多量体形成に関与するロイシンジッパー領域及び SOMO1 化部位が PML I による分化促進に必須であることが示された。特に SUMO1 化部位である 3 箇所のリジンをアルギニンに置換した変異体は、野生型とは正反対に G-CSF 存在下での増殖を促進し、分化を阻害することが示され、この変異体はドミナントネガティブに作用すると考えられた。

以上、本論文は転写 AML1 と転写共役因子 PML が相互作用して機能し、骨髄性細胞の分化に重要な役割を演じていることを明らかにした。本研究は白血病の原因とされる 2 つの主要な因子である AML1 と PML が 1 つの複合体として共同して作用することを示した点で造血細胞の分化や白血病発症の分子メカニズムの解明に多大な貢献をすると考えられ、学位の授与に値する。