

審査の結果の要旨

氏名 島 豊

「新規 F-box protein Fbx3 の機能解析」と題する本論文は急性前骨髄球性白血病の主要な発症原因となっている PML (前骨髄球性白血病蛋白質: 15 番染色体と 17 番染色体の転座のターゲットである白血病関連蛋白質) と複合体を作って機能する蛋白質の探索の結果新たに発見された F-box 蛋白質である Fbx3 が、PML との相互作用を介して細胞分化を制御する分子機構を追求した結果を述べたものである。学位申請者は、急性前骨髄球性白血病細胞から PML 複合体を精製した結果、Fbx3 を含む SCF (Skip1、Cullin 1、F-box protein) 複合体構成蛋白質であることを見出した。この複合体における Fbx3 の機能は不明であったので、その解析を試みた。この蛋白質が、PML との相互作用を介して複数の SCF 複合体と相互作用のある蛋白質のユビキチン化とそれに伴う分解を制御していることを明らかにした。

本論文は、序論、実験方法、結果、考察に分けられており、全体が一報の長編論文の如き構成になっている。主要な部分は「結果」であり、三つの部分に分けて述べられている。

第一の部分では、PML と結合するという性質によって Fbx3 を同定した経緯が述べられている。まず、N 末端側に FLAG-tag をつけた PML I を安定に発現する白血病細胞 K562 が作製され、この細胞の可溶化物から抗 FLAG 抗体を用いて、PML を含む複合体が精製された。その構成成分に Fbx3、Skp1、Cul1 が含まれることが明らかとなったので、これが Fbx3 を含むユビキチンリガーゼ SCF 複合体であることが予想された。この細胞から、Fbx3 の cDNA をクローニングし、これを BOS23 細胞に Skp1、Cul1、及び ROC1 とともに一過性に発現させたところ、SCF 複合体を形成することが明らかとなった。新規 F-box 蛋白質が同定されたので、これを含む複合体を SCF^{Fbx3} 複合体と呼ぶこととした。

第二の部分では学位申請者は SCF^{Fbx3} 複合体によるユビキチン化の標的となる蛋白質を同定することを試み、PML と相互作用を持つことが既に知られていた p300 と HIPK2 がそれらであり、ユビキチン化によってこれらの蛋白質のプロテアソームを介する分解が誘導されることを明らかにした。実験はこれらの蛋白質を Fbx3 とともに BOS23 細胞に一過性に発現させ、転写因子複合体構成タンパク質の発現量に与える影響を Western blotting で解析した。その結果、p300 と HIPK2 の発現量が減少し、この減少はプロテアソーム阻害剤 MG132 処理により回復した。さらに、Fbx3 の F-box domain を欠損させることによって、SCF 複合体を形成できないようにすると、プロテアソームを介する分解を誘導しなかった。

これらの結果は、Fbx3 が SCF 複合体を形成し、これと相互作用して転写制御複合体を形成する p300 や HIPK2 のプロテアソームを介する分解を促進していることが示唆された。Fbx3 と p300 及び HIPK2 が実際に結合するかどうか、BOSC23 細胞にこれらの蛋白質を一過性に発現させ、免疫沈降を行った結果、いずれの場合も MG132 を処理したときのみ結合が検出できた。すなわち、Fbx3 に結合した p300 や HIPK2 は速やかにプロテアソームを介した分解を受けることが示された。

第三部では、PML が SCF^{Fbx3} 複合体の機能にどのような影響を及ぼすかが検証された結果が述べられている。Fbx3 と p300 の他に、PML を BOSC23 細胞に一過性に発現させると、SCF^{Fbx3} 複合体による p300 の分解が抑制され、PML は p300 を安定化させることが明らかとなった。同様な一過性の発現実験を MCF7 細胞を用いて行い、産物である蛋白質の局在を観察した結果、PML を発現させると Fbx3 と p300 も PML に特徴的な核内 nuclear bodies への斑点状の局在を示した。この細胞を MG132 で処理すると、PML の核内 nuclear bodies への斑点状の局在は変わらないが、Fbx3 と p300 は PML を発現させなかった時と同様に核全体に拡散した。学位申請者は、細胞を MG132 を処理することで、核内 nuclear bodies 以外の場所でのプロテアソームによって分解された p300 や Fbx3 が分解されずに可視化されたためであると考察している。

考察の部分では、PML と結合する蛋白質として同定された Fbx3 が SCF 複合体を形成して p300 や HIPK2 の分解を促進すること、nuclear bodies に局在する PML はこの分解を阻害し、p300 を安定化することの分化制御における意義、白血病細胞の性質との関係が述べられている。すなわち、SCF^{Fbx3} 複合体は PML と協調して迅速な転写制御を可能にするために働いているという可能性が高い。また、急性前骨髄球性白血病で見られる転座に基づくキメラ遺伝子産物である PML-RAR α は核内 nuclear bodies の形成を阻害し、SCF^{Fbx3} 複合体による p300 や HIPK2 の分解誘導を抑制できず転写因子複合体を安定化できないことが、分化阻害につながっていると推測している。

蛋白質のコピキチン化は、細胞周期の制御や細胞分化に伴う転写制御などに関わると考えられ、その制御因子として多種類の F-box 蛋白質が注目されるが、それらのほとんどに関して分子機能が未知であった。本学位論文に記載されている研究内容は、これを明らかにすることを通して白血病の病態形成機構を分子レベルで解明する糸口をつかんだ成果であり、腫瘍生物学、細胞遺伝学における重要なブレークスルーである。従って本研究を行った島豊は博士(薬学)の学位を取得するにふさわしいと判断した。