

審査の結果の要旨

氏名 吉見 (山本) 真弓

本研究は造血及び白血病発症に関わる転写因子 AML1/Runx1 のリン酸化修飾が T 細胞分化及び造血発生における役割を明らかにする為に初代培養の系を用いて実験を行い、下記の結果を得ている。

1. はじめに、AML1 のリン酸化部位として過去に報告のある 4 つのセリン (S)・スレオニン (T) 残基 (S276, S293, T300, S303) に注目し、これら 2 つ、或いは 4 つをアラニン (A) に置換したリン酸化抑制変異体 (AML1-2A, AML1-4A)、及びアスパラギン酸 (D) に置換したリン酸化模倣変異体 (AML1-4D) を作成し、機能解析を行った。

AML1 条件的欠損マウスの胎仔肝細胞及び造血支持細胞培養系 (FL/△OP-9 Culture) を用いて各リン酸化変異体の T 細胞分化誘導能を調べた。T 細胞の DN から DP 期への移行に関し、AML1-4D は野生型 AML1 と同程度の分化を示したのに対し、AML1-2A では若干の、そして AML1-4A では明らかな分化能の低下を認めた。また、DN 期での CD4 遺伝子発現に関しては、野生型 AML1 と比較し、AML1-4A ではわずかに発現上昇しているように見えたが、統計解析において有意差を認めなかった。以上のことから AML1 の 4 か所のセリン/スレオニン残基におけるリン酸化修飾は、T 細胞分化における DN から DP 期への移行に重要であることが示唆された。

2. 上記 4 か所のリン酸化修飾は過去の報告において、ERK 経路の関与が示唆されていたことから、MEK 阻害剤が DN から DP 期への移行に及ぼす影響について調べた。その結果、MEK 阻害剤は野生型 AML1 による DN から DP 期への移行を抑制する一方で AML1-4D による DN から DP 期への移行には影響を及ぼさないことが明らかとなった。以上より MEK 阻害剤は AML1 依存性 T 細胞分化を阻害し、ERK といった特定のリン酸化経路の関与が考えられた。

3. 続いて、AML1 欠損マウスの傍大動脈臓側中胚葉領域と造血支持細胞培養系 (P-Sp/

OP-9Culture) を用いて各リン酸化変異体の造血発生能について調べた。AML1-4A による血球産生の開始時期は野生型 AML1 や AML1-4D 導入時に比べ遅延したが、最終的には造血能の回復を認め、またフローサイトメトリーにおいて CD45 陽性細胞の出現率も比較したが差を認めなかった。よって AML1 の4か所におけるリン酸化修飾によって AML1 欠損の P-SP 造血は回復可能であることが明らかにされた。

4. これまでの結果を踏まえると、AML1-4A の造血能は若干低下しているものの依然保持されていることが考えられた。そこで上記4か所に加え 462 番目のセリン残基にも注目し、5か所のリン酸化変異体についても調べた。リン酸化抑制変異体である AML1-5A は T 細胞分化における DN から DP 期への移行及び DN 期での CD4 遺伝子発現の抑制、そして P-Sp による初期造血発生、いずれの場合においても完全な機能喪失を示した。一方でリン酸化模倣変異体である AML1-5D は野生型 AML1 と比較し、いずれの場合にも差を認めなかった。以上の結果から AML1 の5か所(S276, S293, T300, S303, S462)におけるセリン/スレオニン残基のリン酸化が協調的・相補的に働くことで、T 細胞分化誘導能及び初期造血発生能に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

以上、本論文は転写因子 AML1 のリン酸化修飾が T 細胞分化及び造血発生には関与していることを明らかにした。これまでの報告において、AML1 は、複数のキナーゼによりリン酸化修飾され、機能調節を受けることは知られていたが、生体内におけるリン酸化修飾の部位・意義については不明であった。しかしながら本研究によって初めて生物学的意義が明らかにされたことは非常に意義深いもので、学位の授与に十分値するものと考えられる。