

学位論文題名

IRF-1 結合分子の同定, 及び, 機能解析

Identification and Analysis of IRF-1-Binding Protein

学位論文内容の要旨

I 緒言

Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1) はインターフェロンシステムにおける転写活性因子として働くのみならず、細胞増殖、及び、アポトーシスを制御していることが示され、癌抑制遺伝子として働くことが明らかとなっている。一方、ヒトIRF-1遺伝子は染色体5q31.1上に存在し、骨髄異形成症候群や白血病において高率に不活化していることが示され、その発症に関与していることが示唆されている。これまでIRF-1の不活化の機序として(1) 遺伝子欠失、(2) スプライシング異常等、が認められているが、他の癌抑制遺伝子であるp53やRbの様に会合分子により制御されている可能性も考えられる。今回、IRF-1会合分子の精製、同定を行い、発癌への関与を検討した。

II 方法

(1) ヒトIRF-1遺伝子を glutathione S-transferase との融合タンパクとして大腸菌で発現させ、glutathione sepharose にて精製し、これを affinity column として用いた。[3 5 S]-methionine/cysteine にてラベルした白血病由来細胞株K-562の核、及び、細胞質抽出物を、この affinity column と会合させ、IRF-1に結合する核内分子IRF-BPを同定した。更に、ヒト肺線維芽細胞株WI38を用いて、細胞周期とこの分子の関連を調べた。

(2) 上記IRF-1 affinity column を用いてIRF-BPを粗精製した後、SDS-PAGEにてIRF-BPを分離、精製し、electroelution法にて回収した。この精製IRF-BPのアミノ酸配列を解析しIRF-BPを同定した。この結果よりIRF-BP cDNAを単離した。

(3) 単離したIRF-BP cDNAを発現ベクターに組み込み、IRF-1の発現ベクター、ルシフェラーゼレポーター遺伝子と共に細胞に導入し、IRF-BPがIRF-1の転写活性に及ぼす影響を検討した。さらに大腸菌にて発現し精製したIRF-1、IRF-BPタンパクを用い、electrophoretic mobility shift analysis (EMSA)を行い、IRF-BPがIRF-1のDNA結合能に及ぼす影響を検討した。

(4) 白血病細胞、白血病由来細胞株におけるIRF-BP mRNAの発現を検討し発癌への関与を検討した。

(5) IRF-BPが癌遺伝子として働くか否かをNIH 3T3細胞を用いたトランスフォーメーションアッセイにて検討した。NIH 3T3にIRF-BP遺伝子を導入しIRF-BP高発現株を樹立し細胞倍加時間、飽和細胞密度、軟寒天培地でのコロニー形成能、ヌードマウスへの造腫瘍能を検討した。

III 結果

(1) IRF-1 affinity columnにより核に豊富に存在する38Kdの分子(IRF-BP)が同定された。更に、ヒト肺線維芽細胞株WI38を用いて、細胞周期とこの分子の関連を調べたところ、細胞増殖に関連しIRF-1に結合することが示された。IRF-1は細胞周期においてG1 arrest期にその発現が最高となり、細胞にIRF-1を高発現するとG1 arrestを誘導することから、IRF-BPはIRF-1と相反することが示唆された。

(2) IRF-BPを精製し、そのアミノ酸配列を解析したところ、IRF-BPは核小体タンパクとして報告されていたNucleophosmin (NPM)と同一であることが明らかとなった。報告されているNPM cDNA配列よりRT-PCR法にてIRF-BP/NPMの遺伝子を単離した。

(3) ルシフェラーゼアッセイでは、IRF-BPはIRF-1依存性の転写活性を抑制した。さらにEMSAではIRF-BPはIRF-1のDNA結合能を阻害することが判明した。即ち、IRF-BPはIRF-1のDNA結合能を阻害することによりIRF-1依存性の転写活性を阻害することが示唆された。

(4) 白血病細胞、白血病由来細胞株におけるIRF-BPの発現をRNA blottingにて検討したところ、白血病細胞8例中5例において、正常に比し約2倍のIRF-BP発現増加が認められ、白血病由来細胞株では6~10倍の発現増加が認められた。

(5) NIH 3T3細胞にIRF-BPを遺伝子導入して得られたIRF-BP高発現株における形質転換能の検討では、IRF-BP高発現株はコントロールに比し、細胞形態、倍加時間には変化が見られなかったが、飽和細胞密度の2~3倍への増加、軟寒天培地におけるコロニー形成能の獲得を示し、更に、ヌードマウスへの造腫瘍能を示した。この形質転換能はIRF-BPの発現量に相関する傾向を示し、IRF-BPの高発現がIRF-1の癌抑制遺伝子としての作用を阻害することでもたらされたと考えられた。

IV 考案

IRF-1に会合する分子IRF-BPを同定し発癌への寄与を検討した。IRF-BPは核小体タンパクとして報告されていたNPMと同一であったが、IRF-BPがIRF-1の活性に与える影響を検討したところ、IRF-BPはIRF-1のDNA結合能を阻害することが明らかとなった。IRF-BPは細胞周期においてearly G1期に発現が誘導されるというIRF-1と相反した発現パターンをとること、また今回の検討で種々の白血病細胞においてIRF-BPの発現亢進が認められたことにより、IRF-BPが高発現することでIRF-1の作用を阻害し、発癌に寄与することが示唆された。この仮説はNIH 3T3を用いたトランスフォーメーションアッセイでも支持された。今後IRF-BPが高発現する機序を解明することにより、癌抑制遺伝子IRF-1と細胞増殖、及び、癌化のメカニズムの関係が更に明らかとなることが期待される。

V 結語

(1) 癌抑制遺伝子IRF-1に会合する分子IRF-BPを同定したところ核小体タンパクであるnucleophosminと同一であった。

(2) IRF-BPはIRF-1の作用を阻害し、癌遺伝子として働くことが示された。

(3) 一部の白血病細胞ではIRF-BPの発現亢進が認められ、その発症に関与していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 齋 藤 政 樹

学 位 論 文 題 名

IRF-1 結合分子の同定，及び，機能解析

Identification and Analysis of IRF-1-Binding Protein

Interferon Regulatory Factor-1(IRF-1)はインターフェロンシステムの転写活性因子として同定されたが、その後の解析により細胞増殖やアポトーシスを制御し癌抑制遺伝子として機能することが明らかとなった。また、ヒトIRF-1は染色体5q31.1に存在し、骨髄異形成症候群や白血病において高率に遺伝子欠失、mRNAのスプライシング異常を生じ、不活化されていることが示され、それらの疾患への関与が示唆されている。今回、IRF-1結合分子(IRF-BP)による、IRF-1活性の制御機構の存在を仮定し、IRF-BPを分離同定し、発癌への関与を検討した。

Glutathione S-transferaseとIRF-1の融合タンパクを大腸菌AD202株にて発現し、glutathione sepharose beadsにて精製しIRF-1 affinity columnを作製した。このIRF-1 affinity columnに慢性骨髄性白血病急性転化由来細胞株K-562の核分画、細胞質分画抽出物を作用させ、IRF-BPを同定し、精製したのち、そのアミノ酸配列を解析しPCR法にてIRF-BPのcDNAを単離した。次に、IRF-BPがIRF-1の転写因子としての作用に与える影響をルシフェラーゼアッセイ、Electromobility shift analysisにて検討した。更に、白血病細胞、白血病由来細胞株におけるIRF-BP mRNAをNorthern blottingにて検討した。最後にNIH 3T3細胞を用いたトランスフォーメーションアッセイにてIRF-BPの癌遺伝子活性を検討した。

IRF-1 affinity chromatographyでは核分画に豊富な38Kdの分子IRF-BPが認められ、IRF-BPの活性は増殖に関連して検出された。IRF-BPのアミノ酸配列の解析により、IRF-BPは過去に報告されていた核小体タンパクであるNucleophosminと同一であることが示された。IRF-BPの機能解析を行ったところルシフェラーゼアッセイにてIRF-BPはIRF-1依存性の転写活性を抑制することが示され、Electromobility shift analysisではIRF-BPはIRF-1のDNA結合を阻害することが示された。これはIRF-BPはIRF-1のDNA結合能を阻害することにより、IRF-1の転写活性を抑制しているものと考えられた。また、IRF-BP mRNAの発現は健常ドナーの骨髄細胞に比べ、一部の白血病細胞では約2倍に、白血病由来細胞株においては約6~10倍に増加していることが示され、それらの疾患においてIRF-BPの高発現が癌抑制遺伝子IRF-1の作用を阻害している可能性が示唆された。一方、NIH 3T3を用いたトランスフォーメーションアッセイでもIRF-BPは癌遺伝子として働くことが示されたが、この結果はIRF-BPが癌抑制遺伝子IRF-1の作用を阻害し発癌に促進的に働くという仮説を支持するものと考えられた。

口頭発表にあたり、第一生化学の西教授よりIRF-1が癌抑制遺伝子として作用するためのtarget genesは何かという点、他臓器癌の発症においてIRF-BPの高発現が関与しうるかという点、IRF-BPの生理作用はこれまでにどのような報告があるのか等についての質問があった。またIRF-BPに対する抗体を作製し、RNAレベルのみならず蛋白レベルでの解析をすすめるよう助言があった。癌研生化学の斎藤教授からは、IRF-1とIRF-BPとの結合が可逆性であるのかという点、その結合に細胞周期やリン酸化が関与するかという点、IRF-BPのIRF-1結合における特異性、及び、IRF-BPによる癌化機構にはIRF-1以外の因子が関与するか等について質問があったが、申請者はいずれの質問にも概ね妥当な答えをなしたものと考えられた。最後に、主査の浅香教授より今回得られた知見をどのように今後の臨床に生かせるかとの質問があったが、申請者はIRF-1とIRF-BPの発現調節の解明が、新たな白血病治療につながりうる可能性のあることを回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実であり、大学院課程における研鑽も併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。