

学 位 論 文 題 名

MALT1 contains nuclear export signals and
regulates cytoplasmic localization of BCL10

(MALT1は nuclear export signal を持ち、
BCL10の細胞質への局在を制御する)

学位論文内容の要旨

[目的と背景]

MALT リンパ腫は非ホジキンリンパ腫の中で三番目に頻度が高く (約 8 %)、節外性リンパ腫の大部分を占める疾患である。MALT リンパ腫には三つの特徴的な染色体転座が存在する。t(11;18)(q21;q21) 転座では 11q21 の API2 と、18q21 の MALT1 が融合遺伝子 API2-MALT1 を形成する。t(14;18)(q32;q21) 転座では 14q32 の IgH エンハンサーによって 11q21 の MALT1 遺伝子が過剰発現する。t(1;14)(p22;q32) 転座では 14q32 の IgH プロモーターによって 1p22 にある BCL10 遺伝子が過剰発現する。これら API2-MALT1、MALT1、BCL10 全てが細胞質において NF- κ B を活性化することが近年明らかになった。しかし、NF- κ B 活性化以外の機能について検討した報告はない。

一般に、ある分子の細胞内局在とそのメカニズムを検討することは、機能解析を進める上で重要な情報となる。そこで本実験では API2-MALT1、MALT1、BCL10 の細胞内局在とそのメカニズムを検討することを目的とした。特に臨床検体において BCL10 の免疫染色像は多彩であることが知られている。MALT リンパ腫の発生母細胞である post germinal center の B リンパ球では BCL10 は細胞質に染色されるのに対し、t(11;18)(q21;q21) および t(1;14)(p22;q32) 転座を持つ MALT リンパ腫症例では核に染まる。このメカニズムについても考察を加えた。

[方法と結果]

COS7 細胞において一過性発現させた MALT1 および API2-MALT1 は細胞質に局在する。一般に nuclear export signal (NES) という約 10 個程度の短いアミノ酸配列を有する分子は核内で担体タンパク CRM1 と結合し、能動輸送によって核外に排出され、細胞質に移動することが知られている。そこで NES 阻害薬であるレプトマイシン B (LMB) を使用したところ、MALT1 および API2-MALT1 は核に強く蓄積した。このことから MALT1 および API2-MALT1 は NES を持つことが示唆された。

MALT1 のどの部分に NES が存在するかを検討するために数種類の deletion mutant を作成した。これらの細胞内局在を比較検討した結果、MALT1 の 329 番目から 380 番目のアミノ酸からなる領域と (NES1 領域)、461 番目から 562 番目のアミノ酸からなる領域 (NES2 領域) に NES が存在することが示唆された。

この NES1 領域と NES2 領域が本当に核外輸送される機能があるのかを確認するために、これらの領域それぞれに GFP を結合させた fusion タンパクを作成した。GFP 自体は核に局在するのに対し、NES1 および NES2 結合 GFP タンパクは細胞質のみに存在した。一方、LMB 処理後は核内に局在を変えた。この結果から NES1 および NES2 は実際に GFP を核外に輸送する能力があることを示すことができた。

一般に NES のアミノ酸配列にはバリエーションはあるものの、ある程度典型的な配列パターンがあることが知られており、約 10 個程度の短いアミノ酸配列の中に 4 つの疎水性アミノ酸（特にロイシンが多い）が存在するという構造をとる（NES コンセンサスシーケンス：Lx(1-3)Lx(2-3)LxL）。MALT の NES1 領域においては、358 番目から 365 番目のアミノ酸配列が (LTNLLRQL) 最も NES の候補足りえる配列で、また、この配列は種を超えて保存されていた。このアミノ酸配列の後ろ二つのロイシンをアラニンに変えたコンストラクト（NES1 mutant）を作成した。Wild type は細胞質内に局在するのに対して、NES1 mutant は核に局在した。この事実から 358 番目から 365 番目のアミノ酸配列 (LTNLLRQL) が NES であると同定した。一方、NES2 領域でも同様に検討したが、本研究においては NES を同定するには至らなかった。

COS7 細胞において一過性発現させた BCL10 は細胞質と核に局在した。BCL10 は LMB によって局在を変えず、NES を持たないことが示された。BCL10 は MALT1 と会合して複合体を形成することが知られている。そこで MALT1 と BCL10 を COS7 細胞に共発現させ、それぞれの細胞内局在を観察した。BCL10 は細胞質のみに存在し、MALT1 と局在を共にしていた。一方、LMB 処理を加えると、BCL10、MALT1 共に核に存在していた。この事実から BCL10 は MALT1 によって核外に輸送されていることが明らかになった。一方、API2-MALT1 と BCL10 を COS7 細胞に共発現させても、BCL10 の局在は変化せず、API2-MALT1 には BCL10 を核外輸送する能力はないことが明らかになった。

[考察]

これまで MALT1 及び API2-MALT1 は細胞質にのみ存在する分子と考えられていた。本研究は MALT1、API2-MALT1 が核と細胞質を往復していることを示した最初の報告である。この細胞内輸送システムは NES という高度なシステムを介しており、さらにこの NES は種を超えて保存されていることから、MALT1 が核と細胞質間を往復することがリンパ球の生理的機能において何らかの重要な役割を担っている可能性があることを示している。API2-MALT1 においては、核内で MALT リンパ腫形成、維持に働いている可能性も考えられ、これまでの MALT リンパ腫研究に新しい視点を与えるものである。

本研究では BCL10 が MALT1 によって核外に輸送されていることを初めて示した。この新しい知見から、BCL10 の多彩な細胞内局在メカニズムを説明することが可能である。正常リンパ球では MALT1 が BCL10 を核外に輸送している。その結果、BCL10 は細胞質優位に局在すると考えられる。t(11;18)転座を有する MALT リンパ腫症例では片方の 18 番染色体は転座によって API2-MALT1 を形成している。API2-MALT1 は BCL10 を核外に輸送する機能は持たない。全長を有する MALT1 は転座を有しない 18 番染色体からしか供給されないため、BCL10 に対して相対的にタンパク量が減少する。この結果、MALT1 は全ての BCL10 を核外輸送することができず、一部は核内に残存すると考えられる。t(1;14)転座を有する MALT リンパ腫症例では BCL10 が過剰発現しているために MALT1 が相対的に不足する。この結果、BCL10 は核に多量に残存する。この細胞内局在メカニズムモデルは BCL10 の組織免疫染色像と非常に相関している。

[結語]

本研究により MALT1 ならびに API2-MALT1 が NES によって核と細胞質を往復していることを示した。さらに、MALT1 は BCL10 を核外輸送することも明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 武 蔵 学
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

MALT1 contains nuclear export signals and regulates cytoplasmic localization of BCL10

(MALT1は nuclear export signal を持ち、
BCL10の細胞質への局在を制御する)

MALT リンパ腫に特徴的な染色体転座から同定された API2-MALT1、MALT1、BCL10 は、それぞれが細胞質において NF- κ B を活性化する。しかし NF- κ B 活性化以外の機能について報告はない。一般に、ある分子の細胞内局在とそのメカニズムを検討することは、機能解析を進める上で重要な情報となる。そこで本実験では API2-MALT1、MALT1、BCL10 の細胞内局在とそのメカニズムを検討した。COS7 細胞において一過性発現させた MALT1 および API2-MALT1 は細胞質に局在する。nuclear export signal (NES) 阻害薬である レプトマイシン B (LMB) で処理すると、MALT1 および API2-MALT1 は核に強く蓄積した。このことから MALT1 および API2-MALT1 は NES を持つことが示唆された。MALT1 deletion mutant の細胞内局在を比較検討した結果、MALT1 の 329 番目から 380 番目のアミノ酸からなる領域と (NES1 領域)、461 番目から 562 番目のアミノ酸からなる領域 (NES2 領域) に NES が存在することが示唆された。この NES1 領域と NES2 領域それぞれに GFP を結合させた fusion タンパクは細胞質のみに存在し、LMB 処理後は核内に局在を変えた。この結果から NES1 および NES2 は実際に GFP を核外に輸送する能力があることを示した。さらに、MALT の NES1 領域の point mutation mutant の検討から、358 番目から 365 番目のアミノ酸配列が NES 配列であることを同定した。COS7 細胞において一過性発現させた BCL10 は LMB によって局在を変えず、NES を持たないことが示された。一方、MALT1 と BCL10 を共発現させると BCL10 は細胞質のみに存在し、MALT1 と局在を共にしていた。LMB 処理にて BCL10、MALT1 共に核に存在し、BCL10 は MALT1 によって核外に輸送されていることが明らかになった。

口頭発表に際し、副査 今村教授より MALT1 と BCL10 の核内での機能、核内 BCL10 陽性症例と陰性症例の差異に関する質問があった。これに対して申請者は、MALT1 の核内での機能に関する知見は存在しないこと、BCL10 が核内で転写活性化に働いていると報告す

る論文が過去に1報あること、核内 BCL10 陽性症例は陰性症例よりも進行期症例が多いと報告されていることを回答した。次いで副査 浅香教授より炎症由来と転座由来の NF- κ B の差異、API2-MALT1 陽性症例からびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫へ進展する症例がない理由について質問があった。これに対して申請者は、転座陽性症例は転座陰性症例に比べて病理学的に進展した症例が多いことから転座からの NF- κ B の方が増殖に寄与する能力が高い可能性があること、API2-MALT1 陽性症例がびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫へ進展しない理由はまだわかっておらず今後検討しなければいけない事項であることを回答した。さらに主査 武蔵教授より NF- κ B 活性化から転写が亢進する分子の種類、LMB の働く機序と特異性、MALT1 における核移行シグナル(NLS)の有無に関する質問があった。これに対して申請者は、NF- κ B 活性化は API2 などの抗アポトーシス分子や細胞周期活性化に働く分子の発現上昇をもたらすこと、LMB は CRM1 と NES の結合部位に結合することで能動輸送を阻害すること、LMB は NES 特異的であると報告されていること、MALT1 において NLS の存在を証明した報告は存在しないが、これらの分子量は核膜の受動輸送の限界を超えていることから潜在的に NLS が存在する可能性があることを回答した。

本研究は MALT1 ならびに API2-MALT1 が NES によって核と細胞質を往復していることと MALT1 が BCL10 を核外輸送していることを始めて明らかにしたことで高く評価された。この研究をさらに発展させることで、MALT リンパ腫の治療標的の同定や正常リンパ球における未知の細胞内分子機構の解明に寄与することが期待された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位など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。