

博士（薬学）室本竜太

学位論文題名

インターフェロン誘導性タンパク質 Daxx の
転写調節機能および細胞死制御機能の研究

学位論文内容の要旨

序論

Fas death domain-associated protein(Daxx)は近年、リンパ球やB細胞というセルコンテクストにおいて、細胞増殖/生存を抑制する機能をもつことが示唆されている。特に、B細胞発生の初期段階における、I型インターフェロン(IFN)によるB細胞生存抑制機序においてDaxxが必須の役割をもつという報告があり、この過程におけるDaxx機能の制御機構を明らかにすることによって、B細胞腫瘍や自己免疫疾患の発症機序解明や治療薬開発につながる知見が得られると考えられた。

多くの報告はDaxxが核に局在することを示しており、IFNによるB前駆細胞のアポトーシスに際してもDaxxの核局在が観察されている。Daxxは細胞内で promyelocytic leukemia protein(PML)と相互作用し、核内の構造体 PML-nuclear body (PML-NB)にて共局在している。PMLおよびPML-NBはさまざまなアポトーシス誘導に関与する。PML欠損細胞ではPML-NBが形成されず、Daxxは主に nucleoplasm やヘテロクロマチン領域に局在が観察され、Daxxのアポトーシス誘導機能が失われる。このことはPMLがDaxxの細胞内、また、核内での局在を制御しており、この両分子の相互作用がアポトーシス進行に重要な役割をもつことを示している。

これまでに、Daxxの機能はタンパク-タンパク相互作用を介した細胞内局在制御によって影響されることや、リン酸化による制御を受けることが明らかにされてきた。しかしDaxxの機能に対する、DaxxのSUMO化修飾の意義は不明であった。SUMOはおよそ100アミノ酸からなるユビキチン様小分子であり、SUMO化は、SUMOが標的タンパク質のリジン残基に共有結合する反応である。SUMO化を受けた標的タンパク質は機能変換を起こし、この修飾機構は、細胞周期進行や、タンパク質の核移行、相互作用の調整などの細胞内現象に関与することが知られている。DaxxはSUMO結合E2酵素Ubc9と相互作用する。またDaxxはUbc9およびSUMO-1との共発現によってSUMO化を受け、630、631番目のリジン残基がSUMO化部位であると同定されていたが、これまでにDaxxのSUMO化の生理的意義は明らかとなていなかった。

以上の背景から、本研究では、SUMO化部位の変異体、Daxx K630/631A (Daxx KA)分子を用い、IFNによるB細胞生存抑制との関連に着目して機能解析を行った。その結果、新たな知見を得た。

結果と考察

まず、ヒト胎生腎癌細胞株293T細胞、およびマウスプロB細胞株BaF3細胞を用いて細胞内でのDaxxのSUMO化を確認した。Ubc9とSUMO-1を野生型DaxxまたはKA変異体とともに過剰発現させ、DaxxのSUMO化をウエスタンプロット法で解析した。この結果、野生型DaxxではSUMO化が観察されたが、KA変異体では観察されなかつた。また293T細胞で、DaxxのSUMO化がIFN刺激によって増強され、IFNシグナル系とSUMO化反応の関連が示唆された。

次に、DaxxのSUMO化と、Daxxの機能との関連を調べた。まずBaF3細胞を用い、野生型Daxx

または Daxx KA を安定に高発現する細胞株 (BaF3 Daxx WT, BaF3 Daxx KA) を樹立した。BaF3 Daxx WT 細胞では IFN による生存抑制効果が促進されたが、一方で BaF3 Daxx KA 細胞は、IFN の細胞生存抑制シグナルを伝えなかった。また、Daxx のもつ転写抑制機能について一過性発現系でのレポーター・アッセイを行った結果、KA 変異体では glucocorticoid receptor (GR) の転写機能に対する抑制機能が失われていた。

KA 変異体はさらに、野生型 Daxx と大きな違いがあることを、蛍光抗体法による細胞内局在解析により、見いだした。それは野生型 Daxx が主に核に局在することに対して、KA 変異体は大部分細胞質に局在することである。特筆すべきことに、Daxx を核から細胞質へ輸送する分子 CRM1 に対する特異的阻害剤、leptomycin B を用いて細胞を処理すると、KA 変異体は核に蓄積することが観察された。また、この処理によって BaF3 Daxx KA 細胞では IFN 刺激による生存抑制シグナルが伝達されるようになった。これらの結果は、K630, K631 に対する SUMO 化は Daxx が核に貯留するために必要とされること、また、Daxx が核へ蓄積することが IFN による B 細胞の生存抑制に必要とされることを示すものである。

これに加えて、免疫沈降実験による検討から、野生型 Daxx と比較し、KA 変異体は PML との相互作用が弱いことを示した。また、蛍光抗体法による細胞内局在観察から、PML の過剰発現によって KA 変異体は核に局在を移し、特に PML-NB に局在することが観察された。このことから、Daxx の SUMO 化は、PML との結合を増強すること、そしてこれが Daxx の核局在性を規定するのに寄与する可能性が考えられた。

さらに、Daxx-SUMO 融合分子を構築し、解析に用いた。この分子を BaF3 細胞に一過性に過剰発現させたところ、BaF3 細胞の生存率を減少させることが観察されたことから、Daxx と SUMO の結合体は B 細胞の生存を抑制する機能をもつことが示唆された。また、SUMO 結合酵素 Ubc9 のドミナントネガティブ変異体の過剰発現は野生型 Daxx を核から細胞質局在変化させること、BaF3 細胞における Ubc9 過剰発現によって IFN の生存抑制作用が増強されることが観察された。

これらのことから、Daxx に対する SUMO 化は、PML との結合を介した Daxx 核局在性の維持に関与すること、またこれに障害が生じると、IFN 刺激による B 細胞の生存抑制や GR 転写活性に対する抑制機能に異常をきたすことが示された。Daxx と PML の相互作用はアポトーシス促進に重要であるとされている。それゆえに Daxx KA 変異体の PML との結合性低下が、生存抑制機能に影響を与えたと考えられる。

結語

本研究において Daxx の SUMO 化部位である K630, K631 の変異体を用いた解析によって、この部位が B 前駆細胞の生存制御に役割をもつことをはじめて明らかにした。この知見から、Daxx のこの部位に対する SUMO 化を人為的に制御することが、B 細胞腫瘍や自己免疫に対する新たな治療戦略となる可能性を示唆した。また Daxx は B 細胞のみならず、骨髄巨核球前駆細胞に対する IFN による生存抑制においても主要な役割を担うと報告されていることから、Daxx の SUMO 化の制御は、IFN を用いた臨床治療における問題点のひとつである、リンパ球／骨髄抑制の副作用を減少させることに応用できる可能性もあると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査教授 松田 正

副査教授 有賀 寛芳

副査教授 南 雅文

副査助教授 上原 孝

学位論文題名

インターフェロン誘導性タンパク質 Daxx の 転写調節機能および細胞死制御機能の研究

平成18年12月11日に当該申請者に対する学位論文の発表、同14日口頭試問を行い、また平成19年2月9日主論文に関する審査員による書面審査を実施した。

発表内容はインターフェロンによって誘導される Daxx タンパク質の新たな機能に関与する研究である。Daxx は 740 アミノ酸から成る核タンパク質であり、その生理的役割については未解明な部分が多いが、近年、リンパ系細胞において細胞増殖/生存の抑制に重要な役割をもつことが示唆されている。特に、B 細胞発生の過程における、I型インターフェロン(IFN)による B 細胞生存抑制機序において Daxx が必須の役割をもつと報告されたことから、この過程における Daxx 機能の制御機構を明らかにすることは、B 細胞腫瘍や自己免疫疾患の発症機序解明および治療薬開発にもつながると考えられる。

まず、申請者は Daxx の機能の制御に関与する新規結合分子の同定を目的として、酵母 two-hybrid 法を用いて DNA methyltransferase1(DNMT1) associated protein (DMAP1) を同定した。免疫沈降実験よりその相互作用領域を同定した。また、核内で Daxx は DMAP1 を介して DNMT1 と複合体を形成することを明らかにした。さらに、GR 転写活性化に対し、Daxx と DMAP1 は相加的な抑制効果を示すことを明らかにした。さらに興味深いことに、Daxx は DMAP1 をプロテアソーム系タンパク分解から保護することも観察された。これらの結果から、Daxx と DMAP1 が核内で効果的な転写抑制複合体を形成することを初めて示した。

さらに、Daxx の転写翻訳後修飾である SUMO 化部位をアラニンに置換した変異体 Daxx K630/631A (Daxx KA) を用い、IFN による B 細胞生存抑制との関連に着目して機能解析を行い、新たな知見を得た。プロ B

細胞株である BaF3 細胞に Daxx KA 変異体を過剰発現させると、生存抑制シグナルを伝えなかつた。また、KA 変異体は GR の遺伝子転写に対する抑制機能も失われていた。さらに、野生型 Daxx と大きな違いを見出した。それは、野生型 Daxx が核に局在することに対して、KA 変異体は大部分細胞質に局在したことである。特筆すべきことに、CRM1 阻害薬、LMB を用いて細胞を処理することによって、KA 変異体を核に蓄積させることができ、さらには IFN 刺激による生存抑制シグナルが伝達されるようになった。これらの事実は、K630, K631 に対する SUMO 化は Daxx が核に貯留するために必要とされること、また、Daxx が核へ蓄積することが IFN による B 細胞の生存抑制に必要とされることを示すものである。加えて、KA 変異体は野生型よりも、核構造体構成タンパク質 PML との相互作用が弱いことを示した。また、PML の過剰発現によって、KA 変異体は核内に留まることが観察された。このことから、Daxx の SUMO 化は、PML との結合能を増強し、このことが Daxx の核局在性を規定するのに寄与していると考えられる。これらのことから、Daxx の SUMO 化は、PML との結合を介した Daxx 核局在性の維持に関与すること、またこれに障害が生じると、IFN 刺激による B 細胞の生存抑制や GR 転写活性に対する抑制機能に異常をきたすことが示された。本研究では Daxx の SUMO 化部位である K630, K631 の変異体を用いた解析により、この部位がプロ B 細胞の生存制御に役割をもつことをはじめて明らかにした。この知見は、Daxx のこの部位に対する SUMO 化を人為的に制御することが、B 細胞腫瘍や自己免疫に対する新たな治療戦略となる可能性を示すものであり意義深い。

論文発表に続いて発表内容を中心として関連ある専門分野を含めた口頭試問を実施した。その内容は、本研究の背景、目的および関連分野等における知識、また治療薬開発におけるインターフェロンおよびDaxx誘導の有用性とその根拠など多岐に亘った。これらに対する回答は、適切かつ高度なものであり、博士の学位を与えるに相応しいと判断した。提出された学位論文の内容はよくまとまっており、その研究成果は独創的かつ有用性に富み、本専門研究分野の中で高く評価されるに値する内容であると判断した。

以上の結果、本論文審査委員会は、室本竜太氏を博士（薬学）の学位を授与するに相応しい十分な学力と研究能力を有するものと認めた。