

氏 名 (本籍)

くら はし とし ひろ  
倉 橋 敏 裕 (東 京 都)

学 位 の 種 類

博 士 (医 学)

学 位 記 番 号

博 甲 第 4068 号

学位授与年月日

平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件

学位規則第 4 条第 1 項該当

審 査 研 究 科

人間総合科学研究科

学 位 論 文 題 目

The Wnt-NLK signaling pathway inhibits A-Myb activity by inhibiting the association with coactivator CBP and methylating Histone H3

(Wnt-NLK シグナリング経路による転写因子 A-Myb の転写活性化能抑制機構の解析)

主 査

筑波大学教授

博士 (理学)

入 江 賢 児

副 査

筑波大学助教授

博士 (医学)

島 野 仁

副 査

筑波大学助教授

医学博士

内 田 和 彦

副 査

筑波大学助教授

博士 (医学)

本 橋 ほづみ

【236】

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

原癌遺伝子産物である c-Myb は転写因子として機能し、主に造血系細胞の増殖・分化の制御において重要な役割を担っている。最近、本研究室の石井らにより、Wnt シグナルにより c-Myb の分解が誘導され、負に制御されていることが明らかにされた。Wnt シグナルは形態形成や細胞の増殖・分化などの様々な生命現象ならびに癌をはじめとした様々な疾病の発症に関与することが知られている。Wnt がその受容体である Frizzled に結合すると、その後 TAK1/TAB1, HIPK2 といったキナーゼカスケードを経由し、最終的に MAPK 様キナーゼである NLK により c-Myb がリン酸化される。その後、そのリン酸化依存的に c-Myb がユビキチン化をうけ、プロテアソーム系によって c-Myb が分解される。

哺乳類においては c-Myb の他に Myb ファミリー転写因子として A-Myb および B-Myb が知られている。これら Myb ファミリーは、各々が特異的な組織・細胞で発現してはいるが、同一の組織・細胞で発現していることもある。また、同一の標的遺伝子を制御下にもちつつも、生体制御メカニズムにおける役割分担の詳細は明らかではない。Myb ファミリーによる生体制御メカニズムを解明するためにはさらなる知見の蓄積が必要である。そこで、本研究においては、これら Myb ファミリーが Wnt-NLK シグナルによりどのような制御をうけているかを明らかにすることを目的とした。

### (対象と方法)

Wnt-NLK シグナルにより c-Myb の分解が誘導されることが確認されているアフリカミドリザル腎由来の CV-1 細胞を用いた。CV-1 細胞に NLK と A-Myb あるいは B-Myb を一過的に強制発現させ、A-Myb, B-Myb の分解が誘導されるかをウェスタンブロッティングにより調べた。また、NLK, HIPK2 は直接 c-Myb に結合するという知見をもとに、これらの因子が A-Myb, B-Myb にも直接結合するか否かを、GST-pull down assay および免疫沈降法を用いて調べた。Wnt-NLK シグナルの各因子が転写活性化能に与える影響を調べる目的で、Myb の標的遺伝子の一つである c-myc のプロモーター領域を用いてレポーターアッセイを行った。

A-Myb とそのコアクティベーターである CBP との相互作用に対する NLK の影響を調べるために免疫沈降法および *in vivo acetylation assay* を行った。NLK のクロマチンレベルへの影響を調べる目的でクロマチン免疫沈降法を行った。

#### (結果)

GST-pull down assay を行った結果、A-Myb、B-Myb とともに、c-Myb 同様 NLK、HIPK2 と直接結合することが明らかとなった。この結果から、A-Myb、B-Myb とともに NLK と相互作用していることが示唆されたので、CV-1 細胞に A-Myb あるいは B-Myb と NLK とを共発現させることにより、これら因子の分解が誘導されるか否かを調べた。その結果、A-Myb は NLK によりリン酸化されるものの分解は誘導されなかった。一方、B-Myb は分解が誘導された。しかしながらその分解レベルは c-Myb ほど劇的ではなかった。

次に NLK の A-Myb、B-Myb の転写活性化能への影響を調べる目的でレポーターアッセイを行った。その結果、A-Myb、B-Myb とともに NLK により転写活性化能が抑制された。

以上のことから、A-Myb は c-Myb とは異なるメカニズムにより Wnt-NLK シグナルにより制御されていることが示唆された。そこで、分解を介さない NLK による A-Myb の転写活性化抑制のメカニズムを解析したところ、NLK は A-Myb とそのコアクティベーターである CBP との相互作用を阻害していることが明らかになった。

近年、転写の活性化・不活性化とクロマチン修飾の相関関係が詳細に解析されてきている。そこで、NLK による転写活性化抑制におけるクロマチンレベルでの変化を調べる目的で、クロマチン免疫沈降法を行った。その結果、A-Myb に結合した NLK 依存的に A-Myb 結合領域近辺のヒストン H3 の 9 番目リジン残基のメチル化が誘導された。このことから、Wnt-NLK シグナルにより A-Myb の転写活性化能が抑制される際、クロマチン上にヒストンメチル化転移酵素がリクルートされることが示唆された。

#### (考察)

CV-1 細胞において、c-Myb 同様、A-Myb も B-Myb も Wnt-NLK シグナルによって負に制御されていることが明らかとなった。しかしながら、興味深いことに A-Myb は c-Myb とは異なるメカニズムによって Wnt-NLK シグナルによって制御されていた。このことは、A-Myb と c-Myb がともに発現しているような細胞（B 細胞など）において、標的遺伝子の発現制御をいかに分担しているかなどを考えるうえで興味深い。

また、本研究においては主に CV-1 細胞を用いて実験を行ったが、CV-1 細胞には、NLK によってリン酸化された A-Myb を認識してユビキチン化を行う因子が存在せず、結果として分解が誘導されない可能性が考えられる。逆に、CV-1 細胞以外のある種の細胞においては c-Myb は Wnt-NLK シグナルにより分解が誘導されずに負に制御される可能性もある。つまり、細胞や組織の違いそのものが、同一シグナルによるファミリー因子の制御に違いを生み出している可能性が考えられる。

本研究により、Wnt シグナルによる Myb ファミリーの制御には多様性があることが示唆されたが、Wnt-NLK-Myb ファミリーのネットワークが、実際にどのような生命現象の制御に関わっているかは興味深い問題であり、今後の課題である。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

#### (批評)

本研究では、Myb ファミリーの転写因子 A-Myb および B-Myb が Wnt-NLK シグナル伝達系によりどのような制御をうけているかを解析したものである。その結果、すでに報告のある c-Myb 同様、A-Myb、B-Myb

ともに Wnt-NLK シグナル伝達系によって負に制御されることが明らかにされた。また、A-Myb は c-Myb とは異なる機構によって Wnt-NLK シグナル伝達系により制御されることが示された。すなわち、c-Myb は Wnt-NLK シグナルにより分解が誘導されるのに対し、A-Myb は Wnt-NLK シグナルにより分解が誘導されなかった。B-Myb については、Wnt-NLK シグナルにより分解が誘導されたが、その分解レベルは c-Myb ほど劇的ではないことが示された。さらに、分解を介さない NLK による A-Myb の転写活性化抑制の機構として、NLK は A-Myb とそのコアクティベーターである CBP との相互作用を阻害していることが示された。以上の結果より、哺乳類における全ての Myb ファミリーメンバーが、異なる機構により、Wnt-NLK シグナル伝達系によって制御されていることが明らかにされた。これらの研究成果は、Myb ファミリーによる生体における役割分担、および Wnt シグナルによる生命現象の制御メカニズムを解明するうえで有用であり、高く評価される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。