

氏名(本籍)	やま うち とも ひろ 山内智弘(埼玉県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 4772 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 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	Role and regulation of transcription factor Myb in cell cycle progression (細胞周期の進行における転写因子 Myb の役割とその調節)		
主 査	筑波大学教授	博士(理学)	入 江 賢 児
副 査	筑波大学教授	医学博士	久 武 幸 司
副 査	筑波大学教授	薬学博士	永 田 恭 介
副 査	筑波大学講師	博士(医学)	向 井 陽 美

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

転写因子 *myb* 遺伝子ファミリーは細胞の増殖と分化において重要な働きをしているが、その詳細な機能メカニズムと調節機構は不明な部分が多い。脊椎動物では *c-myb*, *A-myb*, *B-myb* の3つのメンバーから構成され、*c-myb* は主として造血系細胞に、*A-myb* は精巣細胞に、そして *B-myb* はほぼ全ての細胞に広く発現していることが知られている。本研究では、(1) *B-Myb* と、(2) *c-Myb* に結合して転写機能を調節する Myb-binding protein 1a (*Mybbp1a*) の2つのタンパク質の機能について、細胞内複合体を精製することでその機能メカニズムと調節機構を明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

N末端側に Flag タグと HA タグを付けた *B-Myb* または *Mybbp1a* 発現ベクターを HeLa 細胞に安定的に遺伝子導入し、内在性の発現量と同程度の株を樹立した。作成した HeLa 細胞株の抽出液から Flag 抗体と HA 抗体のカラム、さらにグリセロール密度勾配遠心法を用いて *B-Myb* または *Mybbp1a* 複合体を精製し、複合体の構成タンパク質を質量分析で同定した。(1) 細胞周期の同調法と免疫沈降法を組み合わせ *B-Myb* 複合体が細胞周期のどの時期に形成されるか調べ、その時の *B-Myb* 複合体の細胞内局在を共焦点顕微鏡やライブセルイメージング技術で調べた。種々の *B-Myb* 欠損変異体を用いて、*B-Myb* が複合体を形成するために必要な領域を決定した。RNAi, コンディショナルノックアウト (Cre-LoxP), アデノウイルスによる供給実験によって、この新規 *B-Myb* 複合体の機能を調べた。*B-Myb* ターゲットの遺伝子発現は、RT-PCR を用いて調べた。(2) 免疫沈降法と GST pull-down assay により、*Mybbp1a* 複合体の結合を確認した。*Mybbp1a* は主に核小体に局在することが知られるので、*Mybbp1a* 複合体と核小体ストレス (actinomycin D, cisplatin, UV) の関係を共焦点顕微鏡, ライブセルイメージング技術, ウェスタンブロッティング法を用いて調べた。

(結果)

(1) *B-Myb* が細胞分裂期特異的に *Clathrin*, *Filamin* と複合体 (*Myb-Clafi* complex) を形成して、スピンドル上に局在することが分かった。また *B-Myb* が *Myb-Clafi* 複合体を形成するために必要なドメインが C 端領域

にあることが分かった。近年 Clathrin はスピンドルを安定化して、染色体の集合を補佐する機能を持つことが明らかにされているが (Nature 434, 1152-1157, 2005), 今回, Myb-Claf1 複合体の形成がこの Clathrin のスピンドル局在に必須であることが突き止められた。実際, Myb-Claf1 複合体の形成を阻害すると, 細胞分裂期の進行の停止と, それに引き続く染色体の異数化やセントロソームの増加が観察された。

(2) Mybbp1a は細胞内において大小二つの複合体を形成していることが分かった。小さい方の複合体には, Mybbp1a (p160^{MBP}) の C 端領域にある核小体移行シグナルを欠損した 140kD (p140^{MBP}) と 67kD (p67^{MBP}) の断片が含まれていた。大きい方の複合体には, p160^{MBP} と種々のリボソームサブユニットが含まれていた。培養細胞においてリボソームの生合成を阻害すると, p160^{MBP} が p140^{MBP} と p67^{MBP} にプロセシングされ, 核小体から核質へとその局在を変えた。二つの Mybbp1a 複合体はともに Nucleophosmin と Nucleolin を含んでいた。これに対して, Nucleostemin が大きい方の複合体にのみ含まれ, Ebp1 が小さい方の複合体にのみ含まれていた。

(考察)

(1) 本研究は, B-Myb がスピンドル上で Myb-Claf1 複合体を形成し, スピンドルを安定化することで細胞分裂を制御しているという, これまで知られていた転写調節以外の新たな機能を示した。Myb-Claf1 複合体の同定は, B-Myb が染色体の安定性や癌の抑制に寄与していることを示唆した。

(2) リボソームストレスによって p160^{MBP} が p140^{MBP} と p67^{MBP} にプロセシングされ, 核小体から核質へ局在を変えることが分かった。二つの Mybbp1a 複合体の発見は, Mybbp1a がリボソーム生合成と, 細胞周期進行や細胞増殖を制御する Myb 依存的な転写をつなぐ役割を担っている可能性を示した。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究では, 細胞の増殖と分化において重要な働きをしている転写因子 *myb* 遺伝子ファミリーの機能と調節機構の解明を目的として, 研究が行われた。著者は, B-Myb と, c-Myb に結合して転写機能を調節する Mybbp1a の 2 つのタンパク質について, 細胞内複合体を精製することで, これらの問題点を解明しようとした。まず, B-Myb については, B-Myb が細胞分裂期特異的に Clathrin, Filamin と複合体 (Myb-Claf1 complex) を形成してスピンドル上に局在すること, B-Myb が Myb-Claf1 複合体を形成するために必要なドメインが C 端領域にあること, Myb-Claf1 複合体の形成が Clathrin のスピンドル局在に必須であることが明らかにされた。また, Myb-Claf1 複合体の形成を阻害すると, 細胞分裂期の進行の停止とそれに引き続く染色体の異数化やセントロソームの増加が観察されることが示された。以上の結果から, B-Myb がスピンドル上で Myb-Claf1 複合体を形成し, スピンドルを安定化することで細胞分裂を制御しているという, これまで知られていた転写調節以外の新たな B-Myb の機能が明らかにされた。次に, Mybbp1a について, Mybbp1a が細胞内において大小二つの複合体を形成していること, 小さい方の複合体には Mybbp1a (p160^{MBP}) の C 端領域にある核小体移行シグナルを欠損した 140kD (p140^{MBP}) と 67kD (p67^{MBP}) の断片が含まれること, 大きい方の複合体には, p160^{MBP} と種々のリボソームサブユニットが含まれることが明らかにされた。また, リボソームストレスによって p160^{MBP} が p140^{MBP} と p67^{MBP} にプロセシングされ, 核小体から核質へ局在を変えることが明らかにされた。二つの Mybbp1a 複合体の発見から, Mybbp1a がリボソーム生合成と, 細胞周期進行や細胞増殖を制御する Myb 依存的な転写をつなぐ役割を担っている可能性が示された。これらの研究成果は, 転写因子 *myb* 遺伝子ファミリーの新しい機能と調節機構を明らかにしたものであり, 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。