

氏名(本籍)	江郷彩子(香川県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第5555号			
学位授与年月日	平成22年8月31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	<b>Ribosomal protein L4 positively regulates activity of a c-myb proto-oncogene product.</b> (リボソームたんぱく質L4はc-mybがん遺伝子産物の活性を正に制御する)			
主査	筑波大学教授	医学博士	高橋	智
副査	筑波大学教授	医学博士	千葉	滋
副査	筑波大学教授	医学博士	久武	幸司
副査	筑波大学准教授	医学博士	竹内	薫
副査	筑波大学講師	博士(理学)	小林	麻己人

## 論文の内容の要旨

### (目的)

*myb* がん遺伝子産物 (Myb) はニワトリ骨髄性白血病ウイルス AMV (Avian Myeloblastosis Virus) や E26 が有するがん遺伝子として同定された。v-*myb* がん遺伝子の細胞側相同遺伝子 c-*myb* は主として造血系細胞で発現しており、その発現レベルは未分化状態の時に高く、分化に伴い低下する。c-*myb* 欠損マウスは胎仔肝臓での造血不全のため、12-13日目の胎仔の段階で致死となり、c-*myb* は未分化造血系細胞の増殖に必須である。これまでの研究から、c-Myb は一群の標的遺伝子の転写を制御することによって、細胞周期の進行、細胞増殖、細胞死の抑制に重要な役割を果たすことが示されている。しかし c-Myb 活性を制御する機構、たとえば上流のシグナル伝達経路などは、不明な点が多い。そこで本論文では、c-Myb の活性制御メカニズムを明らかにするため、c-Myb と結合する因子を同定し、機能解析を行った。

### (対象と方法)

c-Myb の DNA 結合ドメイン (DBD) に結合する因子を B 細胞抽出液から精製し、質量分析によって解析した結果、Ribosomal protein L4 (RPL4) が同定された。293T 細胞に c-Myb および RPL4 を共発現させて、免疫沈降を行い、たんぱく質間相互作用について検討した。また GST pull-down 法で、*in vitro* での両者の結合を確認した。その際、c-Myb の変異体を作製し、結合部位の同定を試みた。CV1 細胞に c-Myb および RPL4 発現ベクターを導入後、蛍光免疫染色法により c-Myb および RPL4 の細胞内局在を調べた。次に、Myb 結合配列を有するルシフェラーゼレポーターからの転写量を測定することで、RPL4 による c-Myb の機能制御について検討した。RPL4 が細胞内で c-Myb の標的遺伝子のプロモーターに結合するか否かを調べるため、マウス白血球前駆細胞である M1 細胞にレトロウイルスを用いて RPL4 を発現させ、クロマチン免疫沈降法により解析した。RPL4 がどのような刺激に応じて c-Myb と結合するのかを調べるため、様々な刺激を与えた細胞から mRNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法により、RPL4 の発現レベルを解析すると共に、

RPL4の局在の変化を観察した。さらに、細胞にRPL4の局在に影響を与える刺激を与えた時の、c-Mybの標的遺伝子の発現をノーザンブロット法により検討した。

#### (結果)

c-MybのDBDに結合する因子としてRPL4を同定し、免疫沈降法、GST pull-down アッセイにより、両者の結合を確認した。またRPL4は、単独では核小体に存在するが、c-Mybと一緒に発現させると核質に移行し、c-Mybと共局在した。さらにRPL4は、c-Mybによって誘導されるルシフェラーゼレポーターの活性を、量依存的に正に制御した。クロマチン免疫沈降法により、RPL4がc-Mybの標的遺伝子である*c-myc* 遺伝子のプロモーター上に、c-Mybと共に存在することを明らかにした。RPL4がどのような刺激に応じて核質に移行するのかを解析した結果、血清飢餓処理およびグルコース代謝阻害で、核質に局在するRPL4の量が低下すると共に、*c-myc* 遺伝子の発現が低下することを明らかにした。

#### (考察)

これまで、c-Mybの活性を制御する因子についていくつか報告されていたが、上流のシグナルなど詳細な機構は不明であった。今回の研究により、c-MybはRPL4と*c-myc* 遺伝子上流のc-Myb結合配列に結合し、転写を活性化すること、血清飢餓やグルコース代謝の阻害によって、核質に局在するRPL4の量が低下することが明らかになった。このことから、成長因子や栄養シグナルによってRPL4が核小体から核質に移行し、c-Mybと結合して*c-myc* 遺伝子の転写の活性化を促進していることが示唆された。c-Myb依存的な*c-myc* 遺伝子の活性化は、細胞周期の進行に重要であることから、RPL4は成長因子や栄養シグナルに応じて細胞周期の進行に関与している可能性が考えられた。

#### (結論)

c-Mybの結合因子として同定されたRPL4は、c-Myb標的遺伝子である*c-myc* 遺伝子のプロモーター上でc-Mybと結合し、転写を活性化した。ほとんどのRPL4は核小体に局在するが、一部は核質にも存在していた。血清飢餓処理およびグルコース代謝阻害を行うと、核質のRPL4の量は低下し、*c-myc* 遺伝子の発現が低下した。

### 審査の結果の要旨

本論文では、c-Mybの活性を制御する新たな因子として、Ribosomal protein L4 (RPL4)を同定した。RPL4は、c-Mybと共に*c-myc* 遺伝子上流のc-Myb結合配列に結合し、転写を活性化すること、血清飢餓やグルコース代謝の阻害によって、核質に局在するRPL4の量が低下することが明らかになった。このことからRPL4は成長因子や栄養シグナルに応じてc-Mybの活性を制御している可能性が示唆された。本論文はc-Mybの新たな活性制御機構を明らかにした論文として、評価できる。

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。