

氏 名	魏 熙 俊
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2540 号
学位授与の日付	平 成 15 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Serine phosphorylation of RUNX2 with novel potential functions as negative regulatory mechanisms (セリンリン酸化を介した RUNX2の負の制御機構)
論文調査委員	(主 査) 教 授 塩 田 浩 平 教 授 月 田 承 一 郎 教 授 野 田 亮

論 文 内 容 の 要 旨

RUNX ファミリー遺伝子は、ヘテロ二量体の α サブユニットをコードし、ヒトでは3種類あることが知られている。RUNX2 は常染色体優性遺伝疾患である頭蓋鎖骨異形成症 (CCD) の原因遺伝子であるとともに、BMP の核内標的分子として、骨形成のマスターレギュレーターの役割を担っている。

申請者は、RUNX2 のセリン残基のうち、進化的に保存された二箇所のセリン-プロリン配列 (S104 と S451) が、それぞれ異なる機構により転写を負に制御することを見出した。すなわち S104 のリン酸化は、RUNX2 の機能とタンパク安定化に必須な PEBP2 β とのヘテロ二量体形成を阻害する。一方、S451 は RUNX2 カルボキシル末端の転写抑制領域に存在し、そのリン酸化が転写抑制のスイッチとなる。

具体的には、① RUNX2 のどの領域がリン酸化されるかを絞込み、リン酸化されるアミノ酸はアミノ末端とカルボキシル末端の2箇所に存在すること、② リン酸化されるアミノ酸はすべてセリンであること、③ 進化的に保存されたセリン-プロリン配列 (S14, S104 と S451) が細胞内でリン酸化されていること、④ セリンをグルタミン酸で置換した変異タンパク (擬態リン酸化) を用いてレポーター・アッセイを行い S104 と S451 の擬態リン酸化 (S104E と S451E) が転写制御を負に抑制すること、⑤ S104E が PEBP2 β との二量体形成を阻害すること、⑥ 転写抑制領域の S451 をアラニンに置換した変異タンパクでは、転写抑制が解除されていたのに対して、S451E では、転写抑制が通常どおり機能すること、等を観察した。以上から、RUNX2 の転写制御は、少なくとも2箇所のセリン残基のリン酸化で制御され得ることが示された。

最近、申請者の所属する研究室では、RUNX タンパクはユビキチン-プロテオソーム系により分解され不安定であること、RUNX のユビキチン化は PEBP2 β との二量体形成により阻害されることを報告した。S104E が PEBP2 β との二量体形成を阻害することから、この制御が RUNX のタンパク安定性を調節している可能性が考えられる。そこでウエスタンブロットティングで検討したところ、細胞内において S104E はタンパク量が減少するが、PEBP2 β の強発現によってもタンパク量が回復しなかった。これらのデータは S104 のリン酸化は二量体形成を阻害し RUNX2 の分解を促進することを強く示唆している。

興味深いことに、S104 がアルギニンに置換 (S104R) された CCD 患者の例が報告されている。申請者は、S104R の性質が S104E とほぼ同様であることを見出した。つまり、S104R は S104E と同様、PEBP2 β との二量体形成を阻害し、タンパク質の半減期も短縮している。また、S104R は S104E と同様転写活性機能が著しく落ちていることをレポーター・アッセイで確認している。この患者の例では RUNX2 が安定化されず分解されることが病気の原因であると考えられる。

以上の解析結果は、RUNX ファミリー間で保存された二箇所のセリン-プロリン配列が、リン酸化により、転写を負に制御していることを示している。しかし申請者は RUNX2 の他のアミノ酸のリン酸化も見出しており、リン酸化による転写調節の全容解明は今後の研究を待たなければならない。RUNX ファミリー間で保存されたリン酸化機構の解明は、CCD のみならず RUNX が関与する他の疾患の原因解明においても重要と考えられる。

論文審査の結果の要旨

RUNX ファミリー遺伝子はヘテロ二量体からなる転写因子のアルファ・サブユニットをコードし、ほ乳類には3種存在する。その内の一つ RUNX2 は、骨形成のマスター・レギュレーターと考えられている。申請者は、RUNX2 に存在する3個のセリン・リン酸化部位 (S14, S104, S451) を同定し、それらの残基を他のアミノ酸に置換した変異体を用いた実験から、RUNX2 の機能が2種の独立した機構による制御を受けていることを明らかにした。すなわち、第一の機構は、S451 のリン酸化による機能抑制ドメインの作用増強、第二の機構は、S104 のリン酸化によるベータ・サブユニットとの二量体形成の阻害と RUNX2 自体の不安定化である。興味深いことに、遺伝病、鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) においては、RUNX2 の S104 の変異 (S104R) が既に報告されてるが、この変異体もまた二量体形成能を持たず、不安定化していることが確認された。

以上の研究は、骨形成過程における RUNX2 リン酸化の意義を明らかにし、鎖骨頭蓋異形成症の発生機序の解明に貢献するところが大きい。

したがって本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は平成14年11月28日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。