

氏 名	みな 水 くに まさ よし 水 口 正 義
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2406 号
学位授与の日付	平 成 13 年 7 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 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Identification and characterization of SEB, a novel protein that binds to the acute undifferentiated leukemia-associated protein SET (急性未分化白血病関連タンパク質 SET に結合する新規タンパク質 SEB の単離同定と性状解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 内 山 卓 教 授 上 田 國 寛

論 文 内 容 の 要 旨

set 遺伝子は、急性未分化白血病における t/del(9)(q34) と密接に関わり、細胞白血病化の鍵を握っている。set 遺伝子にコードされるタンパク質 SET は、39kDa の核内リン酸化タンパク質で、N 末端側にプロテインホスファターゼ 2A (PP2A) 活性阻害領域、C 末端側に約50残基に及ぶ長い酸性アミノ酸領域をもつ。また、SET は Wilms 腫瘍細胞において強発現することが知られている。SET の生理機能ならびに白血病化の分子機構を探るため、細胞内で SET と特異的に相互作用するタンパク質を探索し、見出した cDNA の単離とクローニング、またこれによってコードされるタンパク質の性状と機能の解析を行った。

I. 新規タンパク質 SEB の cDNA クローニング

SET 全長をベイトに、HeLa S3 細胞およびマウス胎児 cDNA ライブラリーをブリーとした酵母ツーハイブリッド法により、新規 SET 結合タンパク質 SEB (SET-binding protein) をコードする cDNA (5761bp) を単離した。cDNA の塩基配列から、SEB は1542アミノ酸残基からなり、分子量約 170K をもつと推定された。SEB には SET 結合領域のほかに、癌タンパク質 Ski ホモロジー領域、3 個の分節型 NLS (核局在化シグナル) 様配列、3 個連続する多プロリン配列 PPLPPPPP、6 個の PEST 配列などが存在していた。SET 結合領域は他の SET 結合タンパク質と有意なホモロジーを持たなかったが、ヒトとマウスの間で高度に保存されていた。Ski ホモロジー領域は Ski の形質転換能および二量体形成に重要なドメイン構造と類似していた。

II. SEB mRNA の発現パターンと遺伝子座の決定

SEB の発現は、Northern blot 解析で調べた全ての組織、細胞で観察され、その mRNA のサイズは 5.8kb であった。また FISH 法による解析から、SEB 遺伝子はヒト染色体の 18q21.1 領域に存在することが明らかとなった。この領域は多くの悪性腫瘍において欠失することが知られ、癌抑制遺伝子の存在が予想されている。

III. SEB タンパク質の同定、SET との結合、細胞内局在の解析

SEB の断片ペプチド (アミノ酸166-181番) に対する抗体 (抗 SEB 抗体) を用いた免疫沈降法によりヒト骨肉腫 HOS 細胞で SEB タンパク質を同定した。一方 SET の各種変異体を用いた酵母ツーハイブリッド解析により、SET が182-223 番アミノ酸領域で SEB と結合することが分かった。SET と SEB が HeLa および HOS 細胞内で実際に複合体を形成することは、抗 SEB 抗体、および SEB と融合させた GFP に対する抗体を用いた免疫共沈実験によって確認した。また抗 SEB 抗体を用いた間接蛍光抗体法によって、SEB が SET と同様に細胞の核に局在することを明らかにした。さらに、GFP-SEB 融合タンパク質の cDNA の細胞導入実験で SEB (の NLS) が GFP を核に局在化させることを示した。

以上の結果から、SEB タンパク質が SET と結合してその PP2A 阻害活性を抑制することにより、あるいは Ski の二量体形成を阻害してその形質転換能を抑制することにより、細胞癌化を制御する可能性が示唆された。SEB が癌抑制因子として働く可能性は、SEB の遺伝子座が未知の癌抑制遺伝子の存在を予想される 18q21.1 領域にあることによっても強く支

持される。今回明らかにした SEB の存在とその機能に関する情報は、今後 SET や Ski の関与する発癌の分子機構を解明する上で重要と考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、急性未分化白血病関連タンパク質 SET に結合する新規タンパク質 SEB を単離同定し、その mRNA の発現、遺伝子座、細胞内の局在に関して検討したものである。

まず、酵母ツーハイブリッド法を用いて新規 SET 結合タンパク質 SEB をコードする cDNA を単離し、アミノ酸配列から分子量約 170K のタンパク質と同定した。SEB には SET 結合領域のほかに、癌タンパク質 Ski ホモロジー領域、3 個の分節型 NLS（核局在化シグナル）様配列などが存在していた。SEB の mRNA の発現は調べた全ての組織、細胞で観察され、そのサイズは 5.8kb であった。また FISH 法による解析から、SEB 遺伝子はヒト染色体の 18q21.1 領域に存在することがわかった。SET の各種変異体を用いた酵母ツーハイブリッド解析により、SET の 182-223 番アミノ酸領域で SEB と結合することが分かった。SET と SEB が実際に複合体を形成することは、抗 SEB 抗体、および SEB と融合させた GFP に対する抗体を用いた免疫共沈実験によって確認された。また抗 SEB 抗体を用いた間接蛍光抗体法によって、SEB が SET と同様に細胞の核に局在することを明らかにした。さらに、GFP-SEB 融合タンパク質の cDNA の細胞導入実験で SEB が GFP を核に局在化させることを示した。

以上の研究は、新規タンパク質 SEB を発見し、その性状を解析したもので、今後 SET や Ski の関与する発癌機構の解明に寄与するところが多い。

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13年6月4日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。