

学位論文題名

Stability and subcellular localization of
API2-MALT1 chimeric protein involved in
t(11;18)(q21;q21)MALT lymphoma

(t(11;18)(q21;q21)MALT リンパ腫における
API2-MALT1 キメラ蛋白の安定性と細胞内局在に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景】

t(11;18)(q21;q21)は mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) リンパ腫に特徴的な染色体異常であり、その産物である apoptosis inhibitor 2 (API2)-MALT1 キメラ蛋白は MALT リンパ腫の腫瘍形成に重要な役割を担っていることが示唆されている。API2 遺伝子は 11q21 に位置する。抗アポトーシス作用を持つ inhibitor of apoptosis (IAP) ファミリーの一つであり、N 末端から順に三つの baculovirus IAP repeat (BIR) domain、caspase recruitment domain (CARD)、RING finger domain を持つ。一方、MALT1 遺伝子は 18q21 に位置しており、N 末端より順に death domain (DD)、二つの immunoglobulin-like (Ig-like) domain、caspase like domain (CLD) を持つ。API2 及び MALT1 の融合遺伝子である API2-MALT1 については、機能解析が十分に為されておらずその性状は明らかではない。今回、我々は免疫染色法、ウェスタンブロット法を用いて、API2、MALT1、API2-MALT1 各蛋白の細胞内局在と蛋白安定性について研究を行った。

【方法】

全長 API2、C 末端を欠損した API2 ミュータント (RING domain より C 末端を欠損したもの (API2-RING(-))、CARD より C 末端を欠損したもの (API2-CARD(-)) の二種類)、全長 MALT1、N 末端を欠損した MALT1 ミュータント (二つの Ig-like domain と CLD を含む C 末端 (MALT1-Ig(1 2))、一つの Ig-like domain と CLD を含む C 末端 (MALT1-Ig(2))、CLD より C 末端 (MALT1-CLD) の三種類)、API2-MALT1、C 末端を欠損した API2-MALT1 ミュータントの各 cDNA を発現ベクター (pcDNA3) に組み込んだ。これを COS7 細胞に発現させ、各産物について免疫染色法にて細胞内局在を、ウェスタンブロット法にて各蛋白の安定性を解析した。

【結果と考察】

細胞内局在研究では API2 は細胞質と核に局在し MALT1 と API2-MALT1 は細胞質のみに局在することが示され、API2-MALT1 の作用部位が細胞質であることが示された。API2-MALT1 が検出できた細胞数に比べ、API2、MALT1 を検出できた細胞数は明らかに少なかったことから、プロテアソーム阻害薬である MG132 を用いて再度同様の実験を行った。API2-MALT1 は陽性細胞数は変わらなかったが、API2、MALT1 では陽性細胞数の

増加が認められた。このことから API2、MALT1 の両産物は API2-MALT1 に比し不安定な蛋白であることが示唆された。

ウェスタンブロット法にてこれらの蛋白の安定性を検証したところ API2-MALT1 を遺伝子導入した細胞抽出液からは MG132 の使用の有無に関わらず、同程度量の API2-MALT1 蛋白が検出された。しかし API2 や MALT1 では MG132 を使用しなかった際には産物を検出することが出来ず、MG132 を使用して初めて蛋白の検出が可能となった。以上よりユビキチン-プロテアソーム系を介した蛋白分解に対して、API2 や MALT1 が不安定であるのに対して、API2-MALT1 は安定であることが示された。API2-MALT1 は NF- κ B を活性化することが知られているが、API2-MALT1 が安定発現することにより持続的に NF- κ B を活性化する経路を刺激している可能性が考えられた。

次に API2、MALT1 のミュータントを作成しウェスタンブロット法にて検証したところ、二種類の API2 ミュータント、三種類の MALT1 ミュータントは MG132 を使用しなくても産物を検出できた。API2 ミュータントは共に RING domain を欠損していること、RING domain は API2 自身をユビキチン化する能力を持つことから、RING domain がユビキチン-プロテアソーム系を介した API2 蛋白の不安定性に関与していると考えられた。同様に MALT1 では三種類のミュータントが共通して欠損する DD を含む N 末端が蛋白の不安定性に関与していることが示唆された。更に Ig-like domain をそれぞれ二ヶ所、一ヶ所に保持する MALT1-Ig(1 2)、MALT1-Ig(2)のミュータントは MG132 を使用することにより検出される蛋白量に増加が見られたこと、Ig-like domain を持たない MALT1-CLD は全長の MALT1 や他の二種のミュータントに比し明らかに蛋白量が多かったことから Ig-like domain がユビキチン-プロテアソーム系を介した蛋白の不安定性に関与していることが示唆された。

次に API2、MALT1 の各ミュータントの細胞内局在を検証した。API2 ミュータントは全長 API2 と同様に核と細胞質に局在し、MALT1 ミュータントは全長 MALT1 と同様に細胞質のみに局在していた。このことから API2-MALT1 を形成する際に欠損する API2 の C 末端や MALT1 の N 末端が API2-MALT1 の細胞質への局在を規定するのではなく API2-MALT1 キメラ蛋白に残存する MALT1 の C 末端部位が API2-MALT1 の局在を規定しているものと考えられた。このことは C 末端を欠損した API2-MALT1 ミュータントが細胞質と核に局在していたことにより確認された。

MALT リンパ腫におけるもう一つの代表的な転座異常である t(1;14)(q22;q32)において強発現が認められる bcl10 も、API2-MALT1 と同様に NF- κ B を活性化することが知られている。NF- κ B の活性化が抗アポトーシス作用に関与していることから API2-MALT1 の MALT リンパ腫における腫瘍化への機序は抗アポトーシスである可能性が考えられた。マウス B 細胞である Ba/F3 細胞に API2-MALT1 を安定発現させ、IL-3 の除去、紫外線照射によるアポトーシス誘導を行ったが API2-MALT1 による抗アポトーシス作用は認められなかった。この結果は postgerminal center B 細胞由来である MALT リンパ腫と pre-B 細胞由来である Ba/F3 細胞の発生段階の違いによるものかもしれない。

【結語】

API2-MALT1 は非常に安定性の高い蛋白であること、その細胞内での作用部位が細胞質であることが示

された。また API2 の C 末端や MALT1 の N 末端が欠落することが、ユビキチン-プロテアソーム系による蛋白分解に対する API2-MALT1 の安定性に寄与していることが示された。この様に安定化した API2-MALT1 蛋白が持続的に NF- κ B を活性化する経路を刺激することが MALT リンパ腫の腫瘍形成に関与していると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

Stability and subcellular localization of API2-MALT1 chimeric protein involved in t(11;18)(q21;q21)MALT lymphoma

(t(11;18)(q21;q21)MALT リンパ腫における
API2-MALT1 キメラ蛋白の安定性と細胞内局在に関する研究)

t(11;18)(q21;q21)は MALT リンパ腫に特徴的な染色体異常であり、その産物である API2-MALT1 キメラ蛋白は MALT リンパ腫の腫瘍形成に重要な役割を担っていることが推測される。しかし API2-MALT1 は NF- κ B を活性化する能力があるという他はその性質や機能については未だ不明な点が多い。今回申請者は全長 API2、C 端を欠損した API2 ミュータント、全長 MALT1、N 端を欠損した MALT1 ミュータント、API2-MALT1 の各発現ベクターを作成し、免疫染色法にて細胞内局在を、ウェスタンブロット法にて各蛋白の安定性を解析した。細胞内局在研究では API2 は細胞質と核に、MALT1 と API2-MALT1 は細胞質のみに局在している事が示された。次にプロテアソーム阻害剤を用いたウェスタンブロット法により蛋白安定性の検証を行ったところ API2 や MALT1 は不安定であるのに対し API2-MALT1 は安定性が高いことが示された。次に API2、MALT1 の各ミュータントの蛋白安定性につき検討を行ったところ API2、MALT1 の両ミュータントはそれぞれの全長のものに比べ安定性が高い事が示された。この事から API2 の C 端や MALT1 の N 端に蛋白の不安定性に関与する部位がある事、API2-MALT1 を形成するにあたりこれらの部位を欠損する事が API2-MALT1 の高い安定性に寄与していることが推測された。次に API2、MALT1 の各ミュータントの細胞内局在を検証した。API2、MALT1 の両ミュータントは、それぞれ全長のものと局在が変わらない事が示された。以上より API2 の C 端ではなく、API2-MALT1 に残存する MALT1 の C 端が API2-MALT1 の細胞質への局在を規定しているものと考えられた。

これらの結果より、安定化した API2-MALT1 蛋白が細胞質に局在することにより持続的に NF- κ B を活性化する経路を刺激することが MALT リンパ腫の腫瘍形成に関与していると推測された。

口頭発表に際し、副査の長嶋教授より MALT1 における核外移行シグナルの有無、API2 や MALT1 におけるユビキチン化の認識部位の有無、API2 や MALT1 の発現が高い臓器、抗 API2-MALT1 抗体による腫瘍細胞の同定、につき質問があった。これに対し申請者は、MALT1 の C 端に核外移行シグナルに類似した部位が存在すること、追加実験ではユビキチン化認識部位の有無については確認出来なかったこと、API2 は各臓器に普遍的に発現し MALT1 は造血系臓器に高発現が認められること、API2-MALT1 に対する抗体は作成中であることを回答した。次に副査の浅香教授より、API2 や MALT1 の腫瘍細胞における発現率、API2-MALT1 が低悪性度の MALT リンパ腫にしか認められない理由、*H. pylori* の API2-MALT1 に及ぼす影響、API2-MALT1 の細胞質での役割につき質問があった。これに対し申請者は、抗体が存在しないため病理組織における陽性率は不明であること、API2-MALT1 が低悪性度の MALT リンパ腫しか形成しない理由は不明であること、*H. pylori* が API2-MALT1 遺伝子を誘導するという証拠は現時点では存在しないこと、細胞質において API2-MALT1 は I κ B と結合して不活性化状態にある NF- κ B に影響を及ぼしている可能性があることを回答した。次に主査の小林教授より、遺伝子導入により細胞質に発現するはずの API2 が核にも局在する理由、MALT1-API2 の存在の有無、RING domain を欠損することによって API2-MALT1 が抗アポトーシス作用を示す可能性について質問があった。これに対し申請者は、未確認であるが API2 の N 端に核内移行シグナルが存在する可能性があること、ノザンプロッティングでは MALT1-API2 は認められないこと、API2 における抗アポトーシス作用の責任部位は BIR domain であることから、どの API2-MALT1 亜種にも存在する BIR domain の作用により抗アポトーシス作用を示す可能性があることを回答した。最後にフロアの大場医師から API2-MALT1 の遺伝子導入により細胞に形態学的な変化は見られるか質問があった。これに対し申請者は形態学的な変化は見られないと回答した。

本研究は API2-MALT1 の局在や蛋白の安定性を初めて解析した研究として高く評価され、この研究を足がかりに API2-MALT1 の MALT リンパ腫における腫瘍形成の機序が明らかにされる事が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。