氏　　名	すがの　　わかな **菅　野　稚　奈**
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第　４８２　号
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科　機能科学専攻
学位論文題目	**Studies on functions of *Drosophila* myeloid leukemia factor in cell cycle regulation** （細胞周期制御におけるショウジョウバエ骨髄性白血病因子ｄＭＬＦの機能に関する研究）
審査委員	(主査) 教授　山口政光 教授　竹谷　茂 教授　森　　肇

論文内容の要旨

申請論文は、第１章「序論」、第２章「ショウジョウバエ骨髄性白血病因子 dMLF の新規核局在シグナルの同定」と第３章「ショウジョウバエ骨髄性白血病因子 dMLF とその相互作用因子 dCSN3 の解析」から構成されている。

第１章では、本論文の背景と目的が述べられている。ヒト骨髄性白血病遺伝子 *myeloid leukemia factor 1* (*hMLF1*)は、染色体の相互転座により産生されるキメラ遺伝子 *NPM-hMLF1* として最初に同定された。この hMLF1 のショウジョウバエホモログである dMLF は、これまでに細胞増殖に関与する転写制御因子である DNA replication-related element-binding factor (DREF)や、Hedgehog シグナル伝達系に関与する dSu(fu)と直接相互作用することが見出されており、また神経変性疾患のひとつであるポリグルタミン病のショウジョウバエモデルにおいて、ポリグルタミンが誘導する表現型が dMLF の共発現によって抑圧されることが報告されている。さらに、dMLF を様々な組織で過剰発現させると発生異常が引き起こされ、dMLF の突然変異体は致死であることが明らかとなっている。これらのことから、dMLF は生体内で複数の機能をもつと考えられるが、dMLF の生化学的な機能や、細胞内においてどのような役割を担っているのかは未だ明らかになっていない。本論文ではこのような背景のもとに、dMLF の細胞内局在について検討するとともに、dMLF の生体内機能とその相互作用因子についての検討を加えた。以下、第２章と第３章の要旨を示す。

第２章：dMLF に特異的な抗体を作製し、dMLF の細胞内局在について調べた結果、dMLF は初期胚や培養細胞において核に局在していることが明らかになった。ショウジョウバエでは、スプライシングバリアントによって産生される dMLF の複数のアイソフォームがそれぞれ異なる細胞内局在を示すことが報告されている。この異なる細胞内局在を示す原因を調べるため、dMLF のアイソフォームのひとつである dMLFA の欠失変異体を EGFP との融合タンパク質として培養細胞内で発現させ、その細胞内局在を観察した。その結果、dMLFA のカルボキシル末端（C 末端）４０アミノ酸領域が核局在に必要十分であることが明らかになった。また、この領域内に２箇所の核局在シグナルが想定された。部位特異的突然変異を導入した解析から、dMLFA の完全な核局在には２箇所共に必要であることがわかった。

第３章：ショウジョウバエ複眼原基で dMLF を過剰発現させると、成虫の複眼が矮小化する

small-eye 表現型を示すことが報告されているが、dMLF と Cyclin E を共発現させると small-eye 表現型が抑圧された。これは dMLF が細胞周期において負の制御に関与していることを示唆する結果である。一方 dMLF を過剰発現させた培養細胞では Cylin E mRNA 量に変化は見られず、dMLF は *Cyclin E* 遺伝子の転写量の制御ではなく、翻訳段階あるいは Cyclin E タンパク質の分解を制御していることが予想された。そこで、COP9 シグナロソーム複合体のサブユニットである CSN3 に着目した。COP9 シグナロソーム複合体は、細胞周期やシグナル経路、発生や分化に関与している８つのサブユニットからなる複合体である。以前にヒトの実験系で CSN3 が hMLF1 の相互作用因子として同定されており、さらにショウジョウバエにおいて COP9 シグナロソーム複合体が Cyclin E の分解に関与していることが報告されている。免疫沈降法及び GST プルダウンアッセイを行った結果、ショウジョウバエにおいても dMLF が dCSN3 と直接相互作用することが明らかになった。 また、dMLF が dCSN3 と遺伝学的に相互作用することを確認した。また dCSN3 の欠失変異体を用いた GST プルダウンアッセイにより、dMLF は COP9 シグナロソーム複合体形成に必要な dCSN3 の PCI ドメインに結合していることが示唆された。これらの結果から、dMLF が COP9 シグナロソーム複合体の形成に対し阻害的な影響を与えることが示唆され、細胞周期制御における dMLF の機能について考察が加えられている。

論文審査の結果の要旨

ヒト骨髄性白血病遺伝子 *myeloid leukemia factor 1* (*hMLF1*)は、染色体の相互転座により産生されるキメラ遺伝子 *NPM-hMLF1* として最初に同定された。この hMLF1 のショウジョウバエホモログである dMLF は、これまでに細胞増殖に関与する転写制御因子である DNA replication-related element-binding factor (DREF)や、Hedgehog シグナル伝達系に関与する dSu(fu)と直接相互作用することが見出されており、また神経変性疾患のひとつであるポリグルタミン病のショウジョウバエモデルにおいて、ポリグルタミンが誘導する表現型が dMLF の共発現によって抑圧されることが報告されている。さらに、dMLF を様々な組織で過剰発現させると発生異常が引き起こされ、dMLF の突然変異体は致死であることが明らかとなっている。これらのことから、dMLF は生体内で複数の機能をもつと考えられるが、dMLF の生化学的な機能や、細胞内においてどのような役割を担っているのかは未だ明らかになっていない。

申請者は dMLF に特異的な抗体を作製し、dMLF の細胞内局在について調べた結果、dMLF が初期胚や培養細胞において核に局在していることを明らかにした。ショウジョウバエでは、スプライシングバリアントによって産生される dMLF の複数のアイソフォームがそれぞれ異なる細胞内局在を示すことが報告されている。この異なる細胞内局在を示す原因を調べるため、次に dMLF のアイソフォームのひとつである dMLFA の欠失変異体を EGFP との融合タンパク質として培養細胞内で発現させ、その細胞内局在を観察した。その結果、dMLFA のカルボキシル末端（C 末端）４０アミノ酸領域が核局在に必要十分であることを明らかにした。また、この領域内に２箇所の核局在シグナルが想定されたが、部位特異的突然変異を導入した解析から、dMLFA の完全な核局在には２箇所共に必要であることを明らかにした。

ショウジョウバエ複眼原基で dMLF を過剰発現させると、成虫の複眼が矮小化する small-eye 表現型を示すことが報告されているが、dMLF と Cyclin E を共発現させると small-eye 表現型が

抑圧された。これは dMLF が細胞周期において負の制御に関与していることを示唆する結果である。一方 dMLF を過剰発現させた培養細胞では Cylin E mRNA 量に変化は見られず、dMLF は *Cyclin E* 遺伝子の転写量の制御ではなく、翻訳段階あるいは Cyclin E タンパク質の分解を制御していることが予想された。そこで、申請者は COP9 シグナロソーム複合体のサブユニットである CSN3 に着目した。COP9 シグナロソーム複合体は、細胞周期やシグナル経路等に関与する８つのサブユニットからなる複合体である。以前にヒト CSN3 が hMLF1 の相互作用因子として同定されており、またショウジョウバエの COP9 シグナロソーム複合体が Cyclin E の分解に関与していることが報告されている。申請者は、免疫沈降法及び GST プルダウンアッセイにより、ショウジョウバエにおいても dMLF が dCSN3 と直接相互作用することを明らかにした。また、dMLF が dCSN3 と遺伝学的に相互作用することも確認した。また dCSN3 の欠失変異体を用いた GST プルダウンアッセイにより、dMLF は COP9 シグナロソーム複合体形成に必要な dCSN3 の PCI ドメインに結合していることを示した。これらの結果は、細胞周期制御における dMLF の機能についての新しい知見であり、高く評価できる。

学位論文は英文で丁寧に作成されており、論旨も明解であった。本論文の内容は、査読制のある国際的学会誌にすでに公表済みである申請者を筆頭著者とする下記の２編の論文を基礎としている。

1) Sugano, W. and Yamaguchi, M.: Identification of novel nuclear localization signals of *Drosophila* myeloid leukemia factor. Cell Struct. Funct. 32, 163-169, 2007.

2) Sugano, W., Ohno, K., Yoneda-Kato, N., Kato, J. and Yamaguchi, M.: The myeloid leukemia factor interacts with COP9 signalosome subunit 3 in *Drosophila melanogaster.* FEBS J. 275, 588-600, 2008.