

論文審査の結果の要旨

氏名 関 崇生

転写因子 NF- κ B ファミリーは、5つのメンバーで構成されており、細胞内ではホモまたはヘテロ 2 量体で存在している。NF- κ B 活性化経路には主に 2 つの経路が存在し、p50/RelA は古典的経路で p52/RelB は非古典的経路で活性化される。p50/RelA は通常、抑制分子 I κ B α によって細胞質に留められているが、刺激依存的に I κ B α が分解されると p50/RelA が核内に移行し細胞の増殖分化、細胞死の抑制等に関わる遺伝子を発現誘導する。これまでの先行研究で刺激依存的に核内の p50/RelA 量が振動することが分かっており、この機構が転写活性と標的遺伝子の発現誘導を制御していると考えられている。

一方、非古典的経路は p100 が刺激依存的に p52 へとプロセッシングされることで p52/RelB が核移行し、リンパ器官の形成、樹状細胞の分化等に関与する標的遺伝子を発現誘導する。このような非古典的経路の重要性にもかかわらず、古典的経路に比べてその制御機構の解明が遅れている。そこで、本研究は RelB を可視化することで、非古典的活性化経路の新たな制御機構を解明した。

本研究は、初めに *Relb^{Venus/Venus}* マウス作製とその有用性についての検討を行っている。RelB は N 末端領域に転写活性化領域が存在するため、C 末端領域に蛍光タンパク質 Venus を結合し、RelB-Venus を発現するノックインマウスを作製した。*Relb^{Venus/Venus}* マウスはメンデルの法則に従って誕生し、*Relb* 遺伝子欠損マウスで観察される症状は観察されなかった。これらの結果は、RelB-Venus が野生型 RelB と同等の機能を有することを現している。また、抗 Lymphotoxin β receptor (LT β R) 抗体で刺激したマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を観察したところ、RelB の核移行が認められた。従って *Relb^{Venus/Venus}* マウスは、RelB の動態を解析するための優れたツールであることが実証された。

続いて、転写因子 RelB の局在の振動と転写活性の関係について解析している。MEF を抗 LT β R 抗体、または TWEAK で刺激すると、約 40% の細胞で RelB が核と細胞質の間で振動することが明らかとなった。この RelB の振動の周期をフーリエ変換で解析すると、約 2 時間周期であり、p50/RelA の振動とほぼ同じ周期であることが分かった。p50/RelA の振動には、核外移行シグナル (NES) 受容体である CRM1 とタンパク質合成が必要である。それぞれの阻害剤である Leptomycin B (LMB) と Cycloheximide (CHX) を処理すると、刺激依存的に核移行した RelB の核外排出が抑制された。さらに無刺激状態の細胞に LMB を処理すると、p100 と RelB の核内蓄積が見られた。siRNA を用いて NF- κ B 抑制分子であり NES を持つ p100 の発現抑制実験を行うと、約 70% の細胞が自立的な RelB の振動 (約 2 時間周期) を示した。ここまでの結果をまとめると、p100 は RelB を細胞質に留め振動を抑制し、RelB の振動には別の分子が関与していることが示唆された。p100 発現抑制細胞では I κ B α の発現増加が見ら

れたため、siRNAを用いた発現抑制実験を行った。IkB α 発現抑制細胞では、振動が抑制され、p100 + IkB α 発現抑制細胞ではRelBの自立的な振動が抑制された。この結果から、刺激依存的に核移行したRelBはIkB α によっても核外排出されていることが示唆された。さらに、NF- κ B活性依存的にmCherryが発現するレポーターシステムを構築した。RelBが振動、1回核移行、核内維持を示す細胞についてmCherryの発現誘導を解析すると、RelBが振動した細胞では、他の2種類の細胞に比べmCherryの発現が早く強く誘導された。また、LMB処理によってRelBの振動を抑制することで、mCherryの誘導は速やかに減衰することが明らかとなった。従って、RelBは核外移行することで転写活性を増強、維持していることが示唆された。

本研究で得られた結果は、非古典的NF- κ B経路における転写活性制御の新たな分子機構を提唱する。また、多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病において、RelBが恒常的に活性化し癌細胞のアポトーシスを抑制していることが明らかとなっている。従って、本研究における新たな知見は、そのような疾患の治療法を見出す契機となることが期待される。

なお、本論文は、市川一寿教授、大島大輔博士、田口祐助教、秋山泰身准教授、井上純一郎教授との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1,998 字