

論文の内容の要旨

論文題目 質量解析を用いた白血病関連遺伝子 *BAALC* の結合蛋白質の同定
およびその機能解析

氏名 牧 宏彰

【背景】

生体での血球産生においては、血液細胞の発生・分化のヒエラルキーの頂点に自己複製機能と多能性を持つ造血幹細胞が存在する。また、正常の造血維持機構のみならず悪性腫瘍細胞の維持においても一部に自己複製能をもつ細胞分画、すなわち腫瘍幹細胞が存在することが明らかになってきた。造血幹細胞の発生・維持に関わる遺伝子の変異が、白血病などの造血器悪性腫瘍の多くにみられることが知られている。造血幹細胞活性は白血病幹細胞活性と一部共通の分子機構によって維持されていると考えられるが、予後不良白血病において発現が上昇している遺伝子が造血幹細胞活性においても重要な役割を果たしている可能性が高い。*BAALC* (Brain and Acute Leukemia cytoplasmic) は、神経外肺葉由来細胞とヒトの造血幹細胞を含む細胞分画である CD34 陽性細胞で発現が亢進している遺伝子であり、正常核型急性骨髄性白血病においてその発現上昇が予後不良因子として同定された。この分子はヒト造血幹細胞分画にも発現していることから、幹細胞機能を通じて白血病の難治化に関与している可能性が高い。しかし *BAALC* の蛋白質相互作用の機能解析はあまり進んでいない。*BAALC* が高発現している造血幹細胞は個体において骨髓中、特にニッチと呼ばれる特定の部位に局在している。ニッチにおいて造血幹細胞はその、自己複製、増殖、分化、局在、そして休止期を制御され、休止期にいる細胞は多くの抗腫瘍薬に対して低感受性となる。*BAALC* が高発現している白血病幹細胞がニッチにて休止期を維持され、治療抵抗性を示している可能性が考えられる。

本研究で私は質量解析を利用して *BAALC* の結合蛋白質を検索し、*BAALC* との相互作用から白血病における機能を解明することとした。

【研究方法】

I. *BAALC* 過剰発現細胞の質量解析

BAALC 遺伝子を 5x myc-pcDNA3 に導入したコンストラクト及び pcDNA3 empty vector を HEK293T 細胞に遺伝子導入した細胞及び Jurkat 細胞にウイルス導入した細胞を構築した。それぞれから蛋白質を抽出し、Protein G sepharose beads 及び抗 myc 抗体にて免疫沈降反応を行った。反応後の beads を洗浄後に boil にて抽出した蛋白質を SDS-PAGE gel にて電気泳動し、ゲルを染色した。染色したゲルから *BAALC* 発現性の HEK293T 細胞及び Jurkat 細胞に特異的に認められ

るバンドについて質量解析を行った結果 Drebrin1 という蛋白質を同定した。免疫沈降-ウェスタンブロット (IP-WB) アッセイを行い、BAALC と Drebrin1 の結合を確認した。

II. BAALC 及び Drebrin1 の結合部位の検証

FLAG-Drebrin1-pcDNA3 及び、BAALC / Drebrin1 deletion mutant コンストラクトの構築し、BAALC 及び Drebrin1 の結合部位を IP-WB にて検証した結果 BAALC deletion mutant ではいずれも Drebrin1 の結合が低下し、また Drebrin1 の deletion mutant はすべて BAALC と結合した。以上の結果より、BAALC と Drebrin1 は両者ともに複数のドメインを介して複雑な立体構造を作って結合している可能性が示唆された。-

III. 免疫蛍光染色

BAALC と Drebrin1 の細胞内局在を解析するため Cos7 細胞に 5 x myc-BAALC-pcDNA3 及び FLAG-Drebrin1-pcDNA3 を遺伝子導入し、抗 FLAG 抗体及び抗 myc 抗体にて免疫染色を行った結果、それぞれ単独を遺伝子導入すると両者は細胞質全体に存在していたが、両者を同時に導入した際には、細胞質でも特に細胞膜下細胞質に局在することが示され、BAALC と Drebrin1 の両者は結合した状態だと細胞膜下細胞質にリクルートされる可能性が考えられた。

IV. 細胞接着アッセイ

Drebrin1 の機能である接着能に対する BAALC の影響を解析するため BAALC / mock をレトロウィルス導入した Ba/F3 細胞のフィブロネクチンに対する接着能を細胞接着アッセイを行い検証した結果、BAALC 発現細胞の接着細胞数が増加しており、adhesion 機能が上昇していた。このことから Drebrin1 の機能である細胞の adhesion が BAALC 発現細胞においては BAALC と結合した結果亢進させる可能性が考えられた。

V. SDF1 chemotaxis アッセイ

Transwell を用いて BAALC / mock 発現 Jurkat 細胞の SDF1 に対する chemotaxis を検証した結果 BAALC 発現細胞の遊走能がコントロールに比較して亢進する傾向を示したが、有意差は得られなかった。SDF1 はニッチを構成する骨芽細胞へ骨髄細胞をリクルートする遊走因子である。

VI. リン酸化 CXCR4 ウェスタンブロットアッセイ

BAALC 発現細胞において SDF1 と反応した結果生じる CXCR4 の 339 番目のセリンのリン酸化の発現レベルを検証するため、抗リン酸化 CXCR4 抗体を用いた WB を行った。その結果、BAALC 発現細胞ではリン酸化 CXCR4 の発現が上昇していた。また pSIREN retroQ ベクターを用いて mouse DBN1 の shRNA コンストラクトを構築、それぞれ 5 x myc-BAALC / mock Ba/F3 細胞にウィルス導入した細胞では BAALC 発現によるリン酸化 CXCR4 の上昇がキャンセルされ mock 細

胞とほぼ同程度の発現に低下した。

【結論】

造血器腫瘍関連遺伝子 *BAALC* の結合蛋白質として *Drebrin1* を同定した。*BAALC-Drebrin1 complex* は細胞膜下細胞質に局在しており、結果として *Drebrin1* の adhesion 機能などの上昇を誘導した。また同時に *CXCR4* のリン酸化の上昇および *SDF1* 感受性の上昇がみられた。以上の結果から *BAALC* は造血幹細胞において *Drebrin1* と協調し骨髄ニッチにおける基質細胞への migration と細胞への adhesion を促進していると考えられる。また *CXCR4* を活性化することによって *SDF1* 感受性を上昇させ、ニッチでの幹細胞の quiescence への導入を制御していると考えられる。*BAALC* 過剰発現白血病では、ニッチへの adhesion が亢進し、また *CXCR4* 活性上昇による腫瘍細胞の quiescence への導入が促進された結果、薬剤抵抗性を示す population が増加し、臨床における治療抵抗性・生存率の低下に寄与している可能性がある。