

氏名(本籍)	わた なべ ゆき ひで (東京都)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第5478号		
学位授与年月日	平成22年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Negative regulation of TGF-β signaling by TMEPAI (TMEPAIはTGF- β シグナルを負に制御する)		
主査	筑波大学教授	薬学博士	金保安則
副査	筑波大学講師	医学博士	寺島秀夫
副査	筑波大学講師	博士(理学)	松田学
副査	筑波大学講師	博士(医学)	河合弘二
副査	筑波大学助教	博士(理学)	内木隆寛

論文の内容の要旨

(目的)

TGF- β (Transforming-growth factor- β) は、細胞の増殖やアポトーシス、運動など多彩な生体反応を調節しているサイトカインである。そのシグナルは、TGF- β が細胞膜表面に存在する受容体に結合した後、受容体キナーゼによって R-Smad (Receptor-regulated Smad) がリン酸化されることで、シグナルを細胞内へと伝える。その後、R-Smad は Co-Smad (Common-mediator Smad) と複合体を形成し、核へと移行し、他の転写因子と共に標的遺伝子の転写を制御している。この TGF- β シグナル伝達系に異常が生じ、恒常性維持機構の喪失が起ると、発癌や先天性遺伝子疾患などが生じることが知られている。

TGF- β によって発現が誘導される遺伝子のひとつである TMEPAI は様々な癌細胞でその発現が亢進されることが報告されているが、その生理機能に関しては不明な点が多い。そこで、本論文では TMEPAI の機能解析を目的とした。

(対象と方法)

1. 培養細胞を TGF- β で刺激し、TMEPAI が TGF- β シグナルの標的遺伝子であることを RT-PCR 法およびウェスタンブロット法により検討した。
2. ヒトおよびマウスの腫瘍組織における TMEPAI の発現について組織免疫染色法およびウェスタンブロット法により検討した。
3. 培養細胞に TMEPAI を過剰発現させたときの TGF- β ファミリーに及ぼす影響についてルシフェラーゼアッセイ法により調べた。
4. TMEPAI が R-Smad のリン酸化に及ぼす影響について抗リン酸化 Smad 抗体を用いたウェスタンブロット法により検討した。
5. TMEPAI が R-Smad の核移行や TGF- β 標的遺伝子に及ぼす影響について蛍光免疫染色法や RT-PCR 法、ウェスタンブロット法により検討した。
6. TMEPAI を RNAi によりノックダウンした時の影響について調べた。

7. TMEPAI が TGF- β シグナルを抑制することが明らかになったため、TMEPAI と TGF- β 受容体、SARA、Smad との結合を免疫沈降法により検討した。
8. TMEPAI は R-Smad と結合することから、TMEPAI の変異体を作製し、結合部位を調べた。結合部位に変異を導入した変異体を作製し、機能について調べた。
9. TMEPAI と SARA の機能的競合作用について検討した。
10. *Xenopus* 胚を用いて、TMEPAI を過剰発現またはノックダウンしたときの表現型について解析した。

(結果)

1. TMEPAI は TGF- β シグナルの直接の標的遺伝子であった。
2. TMEPAI はヒト乳癌やマウス小腸腺腫において発現が亢進していた。
3. TMEPAI は TGF- β シグナルを特異的に抑制し、BMP シグナルを抑制しなかった。
4. TMEPAI は TGF- β や activin シグナルによる R-Smad のリン酸化を抑制した。
5. TMEPAI は R-Smad の核移行を阻害し、TGF- β 標的遺伝子の誘導を抑制した。
6. TMEPAI をノックダウンすると TGF- β による R-Smad のリン酸化が持続し、TGF- β 標的遺伝子の発現が増強した。
7. TMEPAI は TGF- β 受容体や SARA とは結合せず、R-Smad と結合した。
8. TMEPAI は SIM ドメインを介して R-Smad と結合し、SIM ドメインに変異を導入すると、TGF- β シグナル抑制作用が消失した。
9. TMEPAI は R-Smad の結合に対して SARA と競合した。
10. *Xenopus* 胚に TMEPAI を過剰に発現させると、背側中胚葉誘導を抑制した。また、TMEPAI の発現を抑制すると activin による中胚葉誘導を増強した。

(考察)

TMEPAI は TGF- β シグナルによって発現が誘導され、TGF- β シグナルを抑制し、BMP シグナルを抑制しない、新規のネガティブフィードバック制御分子であることが示された。そのメカニズムは、TMEPAI は R-Smad を捕捉し、R-Smad との結合に関して、R-Smad を受容体キナーゼに提示する役割を担う SARA と競合することで、R-Smad のリン酸化を抑制していると考えられる。また、*Xenopus* 胚では TGF- β と同様のシグナル系を持つ activin シグナルを抑制することで、背側中胚葉誘導を阻害した。さらに、TMEPAI は癌細胞で発現が亢進しており、TGF- β による細胞増殖抑制作用を阻害し、癌の進展に関与している可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、TGF- β シグナルや癌化過程で発現が誘導される遺伝子として見いだされた TMEPAI の生理機能を解明することを目指しており、以下の重要な知見が得られている。すなわち、TGF- β シグナルは R-Smad のリン酸化を介して標的遺伝子の転写を調節しているが、TGF- β シグナルの活性化により発現する TMEPAI が SARA と競合的に R-Smad と結合するために、R-Smad が TGF- β 受容体と相互作用することができなくなり、結果的に TMEPAI は TGF- β シグナルを負に制御することを明らかにしている。また、TMEPAI は乳癌の悪性度に依存して発現が亢進していることも示している。このように、本研究で得られた成果は、非常に興味深く、質の高いものであると評価できる。また、著者の基礎学力や研究遂行能力は優れたものであると評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。