【290】

氏　名（国籍）	王（わん）　蓓（べい）（中　国）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博　甲　第　5104　号
学位授与年月日	平成 21 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	**Roles of mono-ubiquitinated Smad4 in the formation of Smad transcriptional complexes** （Smad 転写複合体形成における共有型 Smad のユビキチン化修飾の役割）

主　査	筑波大学教授	薬学博士	金　保　安　則
副　査	筑波大学教授	医学博士	千　葉　　滋
副　査	筑波大学准教授	医学博士	内　田　和　彦
副　査	筑波大学講師	博士（人間環境学）	森　川　一　也

論　文　の　内　容　の　要　旨

目的：TGF-β ファミリーは多様な生理活性を有するサイトカインであり，細胞増殖の抑制，分化促進，細胞外マトリックスの産生，アポトーシス誘導などの多岐にわたる作用を有している。TGF-β が受容体に結合すると，細胞内の R-Smad はリン酸化されて共有型 Smad（Smad4）と複合体を形成して核内に移行し，Smad 結合配列（SBE）に結合して標的遺伝子の発現を調節する。しかしながら，活性型 Smad 複合体がどのようにして SBE から解離して不活性化されるのかについては不明な点が多い。そこで，本研究では，Smad4 のモノユビキチン化修飾に着目して，活性型 Smad 複合体の不活性化機構を解明することを目的とした。

対象と方法：TGF-β が Smad4 のユビキチン化修飾に及ぼす影響を解析するため，293T 細胞に Smad4 及び Ubiquitin の cDNA を強制発現した後，TGF-β で細胞を刺激して，Smad4 のユビキチン化を検討した。また，HaCaT 細胞を用いて，FLAG-Ubiquitin を恒常的に発現する細胞株を樹立し，内在性 Smad4 のユビキチン化を検討した。次に，p300 や c-Ski が Smad4 のユビキチン化に及ぼす影響と，Smad4 ユビキチン化の Smad complex 形成における役割を免疫沈降法で解析した。また，DNA affinity precipitation 法を用いてユビキチン化 Smad4 の DNA 結合能を解析した。さらに，Smad4 の C 末端に ubiquitin を結合した Smad4-Ub を作製し，その細胞内局在を解析した。

結果：Smad4 と ubiquitin を過剰発現させた 293T 細胞を TGF-β で刺激すると，Smad4 のモノユビキチン化が増加することを見いだした。さらに，FLAG-Ubiquitin を恒常的に発現する HaCaT 細胞を TGF-β で刺激すると，内在性 Smad4 のモノユビキチン化が増加することが明らかとなった。さらに，コアクチベーターである p300 を 293 細胞に Smad4 と共発現させると, Smad4 のモノユビキチン化が促進することが明らかとなった。一方，コリプレッサーである c-Ski の Smad4 モノユビキチン化に対する影響を検討したところ，c-Ski は p300 により促進した Smad4 モノユビキチン化を抑制することが明らかとなった。次に，モノユビキチン化 Smad4 が Smad2 と複合体を形成できるかどうかを検討したところ，モノユビキチン化 Smad4 は Smad2

と複合体を形成できないことが明らかとなった。また，モノユビキチン化 Smad4 は SBE と結合しないことも明らかとなった。さらには，モノユビキチン化 Smad4 を模倣する Smad4-ubiuitin 融合蛋白質の細胞内局在を解析したところ，細胞質にその多くが局在するものの，レプトマイシン B 存在下では核内に存在することから，モノユビキチン化 Smad4 は核外に輸送される可能性が示唆された。

考察：本研究から，Smad4 は TGF-β 依存的にモノユビキチン化されることが明らかとなった。さらに，コアクチベーターである p300 は Smad4 のモノユビキチン化反応を促進し，コリプレッサーである c-Ski は p300 により促進された Smad4 モノユビキチン化を抑制することが明らかとなり，p300 と c-Ski はそれぞれ Smad4 のモノユビキチン化反応における正および負の制御因子であることが示唆された。さらに，モノユビキチン化 Smad4 は Smad2 と複合体を形成できないこと，SBE と結合しないこと，およびモノユビキチン化 Smad4 は核外に輸送される可能性から，Smad4 のモノユビキチン化は，Smad2 からの解離とそれに続く DNA からの解離を誘導して核外へ輸送されるモデルが示唆された。

結論：以上より，Smad 複合体が SBE に結合して p300 をリクルートすると，p300 がヒストンをアセチル化して標的遺伝子の発現を促進するとともに，Smad4 のモノユビキチン化を促進して Smad 複合体の解離と SBE からの解離を引き起こし，解離したモノユビキチン化 Smad4 は核外へ輸送されるものと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は，Smad4 複合体の不活性化メカニズムの解明を目指して，Smad4 のモノユビキチン化に着目してその生理的意義を解析している。その結果，TGF-β 依存的に Smad4 がモノユビキチン化されること，p300 が Smad4 のモノユビキチン化が促進すること，c-Ski は p300 により促進した Smad4 モノユビキチン化を抑制することを明らかにしている。また，モノユビキチン化 Smad4 は Smad2 と複合体を形成できないことが明らかとなった。また，モノユビキチン化 Smad4 は SBE と結合しない可能性，およびモノユビキチン化 Smad4 は核外に輸送される可能性を示唆している。これらの結果から，Smad 複合体が SBE に結合して p300 をリクルートすると，p300 がヒストンをアセチル化して標的遺伝子の発現を促進するとともに，Smad4 のモノユビキチン化を促進して Smad 複合体の解離と SBE からの解離を引き起こし，解離したモノユビキチン化 Smad4 は核外へ輸送されることを考察している。これらの知見は，Smad 複合体の不活性化の分子メカニズムを理解する上で非常に重要であり，新奇性の高い研究成果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極めて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。