

氏名(本籍)	たばたかのり 田畑考統(北海道)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第5102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	<b>Ski corepressor complexes maintain the basal repressed state of the TGF-<math>\beta</math> target gene, SMAD7, via HDAC3 and PRMT5.</b> (コリプレッサー Ski 複合体は HDAC3 and PRMT5 によって TGF- $\beta$ 標的遺伝子である SMAD7 遺伝子の基底抑制状態を維持する)		
主査	筑波大学教授	医学博士	久武幸司
副査	筑波大学教授	医学博士	加藤光保
副査	筑波大学准教授	医学博士	竹内薫
副査	筑波大学講師	博士(理学)	小林麻己人

## 論文の内容の要旨

### (目的)

目的: *SKI* 遺伝子は発癌遺伝子として同定され, その遺伝子産物の過剰発現はトリ胚線維芽細胞を transform する。一方, *SKI* 遺伝子の発現は筋分化を誘導する。このように, *SKI* 遺伝子は細胞の増殖と分化の誘導という正反対の性質を示す。私達の研究室では, Ski が転写コリプレッサーとして機能する事を明らかにし, Ski が Mad などの癌抑制因子による転写抑制に必須であり, 癌抑制因子としても機能する事を明らかにした。また, Ski は Smad に結合し, その転写活性化を抑制して TGF- $\beta$  シグナルを阻害し, 発癌因子として機能すると考えられている。このように, Ski は様々な転写制御因子と相互作用して転写を抑制するが, その作用機構の詳細は不明であった。そこで本研究では, Ski による転写制御機構を明らかにするため, 細胞内における Ski 複合体を精製・同定し, Ski 複合体の詳細な機能解析を行なう事を目的とした。

### (対象と方法)

Ski 複合体を精製するため, FLAG と HA の2つのタグを持つ Ski を発現する HeLa S3 細胞株を作製した。その核抽出液を抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体を用いて精製し, 複合体構成因子を質量分析法, 免疫共沈降法, グリセロール密度勾配遠心法により同定した。Ski 複合体による転写抑制活性を解析するため, ヒストン脱アセチル化アッセイおよびヒストンメチル化アッセイを行なった。Ski 複合体が標的遺伝子の制御領域にリクルートされる事を, クロマチン免疫沈降法により解析した。RNAi 法により Ski 複合体構成因子の発現量を低下させた時の, Ski の転写抑制活性をレポーターアッセイにより, また標的遺伝子の発現変動をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

### (結果)

Ski 複合体構成因子として, ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3, アルギニンメチル化酵素 PRMT5, Smad2/3/4 などを同定した。免疫共沈降法およびグリセロール密度勾配遠心法により, これらの因子と Ski が細胞内で実際に複合体を構成している事が明らかになった。HDAC3 と PRMT5 は, ヒストンをそれぞれ

脱アセチル化, メチル化する事により転写を抑制する。そこで精製した Ski 複合体によるヒストン修飾活性について解析すると, Ski 複合体はヒストンを脱アセチル化およびメチル化した。クロマチン免疫沈降法により, Ski 複合体が TGF- $\beta$  の標的遺伝子である *SMAD7* 遺伝子のプロモーター上に存在する事が示された。Ski, HDAC3, PRMT5 の発現量を siRNA で低下させると, *SMAD7* 遺伝子の発現量が上昇する事が明らかになった。Smad は, Ski 複合体が Smad 結合配列にリクルートされるために必要であると考えられる。Ski が Mad など Smad 以外の転写因子によって標的配列にリクルートされる際の Smad の役割を検討するため, shRNA により Smad4 の発現量が低下した HepG2 細胞株を作製し, Ski による転写抑制活性の変化をレポーターアッセイにより解析した。その結果, Gal4-Ski または Gal4-Mad の転写抑制活性は, Smad4 の有無で変化しない事が示され, Smad4 は Ski の転写抑制活性自体には必要ではない事が示された。

(考察)

これまで Ski は Mad や Smad などと相互作用してそれぞれの標的遺伝子の転写を抑制する事が知られていたが, その詳細な作用機構は不明であった。今回の研究により, Ski 複合体が Smad2/3/4, HDAC3, PRMT5 を含み, Smad2/3/4 によって TGF- $\beta$  標的遺伝子上流の Smad 結合配列にリクルートされ, HDAC3 と PRMT5 の持つ 2 つの異なるヒストン修飾活性により転写を抑制するという, Ski による転写抑制機構の一端が明らかになった。PRMT1 が Smad6 をメチル化する事が報告されているため, Ski 複合体内で PRMT5 が Smad2/3/4 をメチル化して何らかの制御をしている可能性もあり興味深い。Ski は様々な癌で発現が亢進しているため, その転写制御機構を解明する事は癌治療に有用であり, 転写抑制活性の本体として同定した HDAC3 と PRMT5 は分子標的となる可能性がある。

(結論)

1. Ski は HDAC3, PRMT5, Smad2/3/4 などと複合体を構成する。
2. Ski 複合体はヒストン脱アセチル化活性およびメチル化活性を持つ。
3. Ski 複合体は *SMAD7* 遺伝子のプロモーターに結合する。
4. Ski, HDAC3, PRMT5 は, *SMAD7* 遺伝子の発現を抑制している。
5. Ski による転写抑制活性自体に Smad4 は必要でない。

## 審査の結果の要旨

本研究は, Ski による多様な転写調節機能の解明を目的として行われた。著者は, Ski が形成する複合体を単離し, 個々の構成分子の同定を行ったあと, 各種のアッセイ系を利用して, Ski 複合体の詳細な解析を行った。

Ski は HDAC3, PRMT5, Smad2/3/4 などと複合体を構成することを明らかにし, その構成因子の情報をもとに, Ski 複合体はヒストン脱アセチル化活性およびメチル化活性を持つことを示している。また, Ski 複合体の機能解析も合わせておこなっており, Ski, HDAC3, PRMT5 は, *SMAD7* 遺伝子の発現を抑制していることが明らかとなった。さらに, Ski による転写抑制活性自体に Smad4 は必要でないことも示している。

以上の実験より Ski が形成する Ski 複合体の構成因子が明らかとなり, この複合体がヒストン脱アセチル化活性やメチル化活性をもち, クロマチン修飾を行うことが分かった。また, 解析をさらに進め, Ski の標的遺伝子に対する作用機構の一部を明らかにしている。以上の研究は, 正確な実験技術をもとに, 的確な実験計画をたてた上で論理的に進められており, Ski 複合体の機能解明に成功し, その作用機構の理解に大きく寄与している。またがん治療への応用につながる興味深い結果である点も考慮すると, 当研究は高く評価できる。

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。