

氏名(本籍)	稲 光 正 子 (福 岡 県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 5099 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>Functional analysis for negative regulators involved in TGF-<math>\beta</math> family signal</b> (TGF- $\beta$ ファミリーシグナル抑制分子の機能解析)		
主査	筑波大学教授	理学博士	石井哲郎
副査	筑波大学教授	博士(理学)	入江賢児
副査	筑波大学講師	博士(医学)	後藤大輔
副査	筑波大学講師	博士(理学)	松田学

### 論文の内容の要旨

目的：TGF- $\beta$  ファミリータンパク質は、TGF- $\beta$ 、アクチビン、BMP 等から構成されており、細胞増殖抑制、細胞分化、アポトーシス等の幅広いシグナル伝達に関与している。本シグナル制御に関わる因子の遺伝子欠損や変異は、癌進展や種々の疾患を惹起することが知られている。そのシグナル伝達は、2つのセリン/スレオニンキナーゼ型膜受容体と転写制御因子 Smad を介して行われる。Smad ファミリーは、R-Smad (特異型 Smad)、Co-Smad (共有型 Smad)、I-Smad (抑制型 Smad) の3種類に分類され、シグナルを正および負に制御する。本研究では、TGF- $\beta$  ファミリーのシグナル伝達を抑制する機構に関連して、(1) Smad のメチル化修飾と活性調節との関係、(2) シグナル抑制分子 TMEPAI に結合するタンパク質の同定と機能解析、の2点を研究の目的とした。

対象と方法：(1) アルギニンメチル基転移酵素 PRMTs による Smad 分子のメチル化を *in vitro* 系では PRMTs と Smad の GST 融合タンパク質とメチル基供与体の S-adenosyl-L-[methyl- $^3$ H]methionine を用いて検討した。また、COS7 細胞内では HA-PRMT1 と Flag-Smad を発現させて抗メチル化アルギニン抗体で検討した。メチル化アルギニン残基の同定は、電気泳動後のたんぱく質バンドを分離し MALDI-TOF-MS で行った。Smad の 74 番目のアルギニン残基をアラニンに置換した Smad 変異体を作製して、メチル化の有無を *in vitro* 及び細胞内で同様に調べた。既知の Smad6 のシグナル抑制機能に関して、Smad6 変異体と野生型 Smad6 の比較をルシフェラーゼアッセイ法で行った。

(2) TMEPAI に結合するタンパク質を検索するため、免疫沈降を利用した質量分析法と yeast two-hybrid 法を用いた。TMEPAI との結合は、COS7 細胞内に TMEPAI と特定分子種を発現させてそれぞれの結合を免疫沈降法で調べた。TMEPAI に結合するタンパク質の機能アッセイは、TGF- $\beta$  依存的レポーター活性及び NFAT 応答性レポーター活性を用いて評価した。

結果：(1) GST 融合タンパク質を用いた *in vitro* メチル化反応の結果、PRMT1 は Smad6、Smad7 をメチル

化したが Smad3, Smad4 と Smad5 はメチル化しなかった。PRMT4 は GST-Smad6 をメチル化した。PRMT5 と PRMT6 は Smads をメチル化しなかった。また, COS7 細胞内でも PRMT1 が Smad6 および Smad7 をメチル化した。Smad6 の 5 つのアルギニン残基をアラニンに置換した融合たんぱく質を作製し, *in vitro* のメチル化反応と MALDI-TOF-MS 解析より, Smad6 の 74 番目のアルギニンがジメチル化されることを証明した。野生型 Smad6 と Smad6R74A の機能に差が無いかどうか検討するため, HepG2 細胞で BMP シグナル抑制作用, COS7 細胞での BMP I 型受容体への結合, HS-72 細胞での Smad1/5 のリン酸化抑制と増殖などについてそれぞれ検討したが調べた限りにおいて差がみられなかった。

(2) TMEPAI 結合分子の候補として質量分析法では 20 種類, yeast two-hybrid 法では 21 種類の分子を同定した。双方に共通の分子種がみられなかったが, それらの中から RACK1 および calcineurin について TMEPAI との直接的な結合を COS7 細胞内にそれぞれ強制発現させ免疫沈降法で確認した。TMEPAI による TGF- $\beta$  依存的レポーターのルシフェラーゼ活性抑制作用に対して, RACK1 及び calcineurin は影響を及ぼさなかった。さらに, calcineurin が関与する他のシグナル系とのクロストークの可能性を探るため, HepG2 に組み込んだ転写因子 NFAT に応答するレポーター系を構築した。Calcineurin 触媒サブユニットを発現させて NFAT の活性を高め, TMEPAI によるレポーター活性亢進効果に対する Smad3 と ALK5ca による Smad7 とを発現させるとさらに活性が上昇するが, 恒常活性型 calcineurin 及び NFAT と共発現させた結果, NFAT 応答レポーターのルシフェラーゼ活性が著しく亢進した。

考察：(1) Smad 分子が PRMT によってメチル化されることを初めて見出した。I-Smad に属する Smad6 に 11 箇所存在する PRMT1 によるアルギニンメチル化コンセンサス配列の中で, 74 番目のアルギニン残基のみが PRMT1 によってメチル化修飾される。この Smad6 のメチル化の意義については本研究で BMP による Smad1/5 のリン酸化や増殖抑制に対する作用など種々の比較を行ったが, 74 番目のアルギニン残基をアラニンに置換した Smad6R74A と野生型とで残念ながらいずれも機能の違いはみられなかった。Smad のメチル化修飾が TGF- $\beta$  の機能調節に関係するかどうかは今後の課題として残された。

(2) TGF- $\beta$  の抑制因子である TMEPAI に結合する新規因子として, RACK1 と calcineurin を同定し解析した。いずれの分子も TMEPAI の TGF- $\beta$  抑制作用に対して影響を及ぼさなかった。しかし, 興味深いことに, TMEPAI は calcineurin によって活性化される転写因子 NFAT に応答するレポーター活性を著しく亢進させたことから, TMEPAI は calcineurin/NFAT シグナルに関与していることが示唆された。TGF- $\beta$  シグナルが, calcineurin/NFAT シグナルを抑制している可能性があり, 今後の興味深い研究課題と思われる。

## 審査の結果の要旨

本研究は, TGF- $\beta$  シグナルを抑制する Smad6 と TMEPAI に関して, 前者はアルギニンのメチル化修飾について, 後者は結合たんぱく質について丁寧に解析しそれぞれ新しい知見を得た優れた研究成果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。