
TGF- シグナルによる標的遺伝子の
転写調節とその異常

(研究課題番号 14570208)

平成 1 4 年度 ~ 平成 1 5 年度科学研究費補助金 基盤研究(C)(2)
研究成果報告書

平成 1 6 年 3 月

研究代表者 加藤 光保
(筑波大学基礎医学系)

はしがき

Transforming growth factor- β (TGF- β)は、Smadの活性化を介して、標的遺伝子の転写レベルを調節し、細胞の増殖や分化などに多彩な作用を示す。本研究では、TGF- β による細胞増殖抑制反応に必須の標的遺伝子である *c-myc* の転写制御と癌におけるその異常について検討した。また、癌遺伝子産物 *c-Ski* による Smad の機能の抑制についても新たな作用機序を示した。さらに、癌で見つかった変異 Smad である Smad2D450E と、これと相同な変異をもつ Smad3D407E が、異なった作用機序で TGF- β シグナルに優勢抑制作用を示すことを明らかにした。

研究組織

研究代表者：加藤光保（筑波大学・基礎医学系・教授）

研究経費

平成14年度	2,100 千円
平成15年度	2,000 千円
<hr/>	
計	4,100 千円

研究発表

(1) 学会誌など

- 1) Yagi K, Furuhashi M, Aoki H, Goto D, Kuwano H, Sugamura K, Miyazono K, and **Kato M**. *c-myc* is a downstream target of Smad pathway. **J. Biol. Chem.** 277: 854-861, 2002.
- 2) Sasaki T, Suzuki H, Yagi K, Furuhashi M, Yao R, Susa S, Noda T, Arai Y, Miyazono K, and **Kato M**. Lymphoid enhancer factor 1 makes cells resistant to transforming growth factor- β -induced repression of *c-myc*. **Cancer Res.** 63: 801-806, 2003.
- 3) Kondo M, Suzuki H, Takehara K, Miyazono K, and **Kato M**. Transforming growth factor- β signaling is differentially inhibited by Smad2D450E and Smad3D407E. **Cancer Sci.** 95: 12-17, 2004.
- 4) Suzuki H, Yagi K, Kondo M, **Kato M**, Miyazono K and Miyazawa K. c-Ski inhibits the TGF- β signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad binding elements. **Oncogene.** 2004, *in press*.

(2) 和文総説

- 1) トランスフォーミング増殖因子 による転写制御. 蛋白質核酸酵素 48: 2247-2253, 2003.

(3) 口頭発表

国内学会

- 1) Yamane K, Suzuki H, Ihn H, Kato M, Miyazawa K, Tamaki K. Cell type-specific regulation of the TGF- β responsive $\alpha 2(I)$ collagen gene by CpG methylation. 第 26 回日本分子生物学会年会 神戸 2003. 12. 10-13.
- 2) 鈴木裕之、宮澤恵二、加藤光保、宮園浩平. Smad による転写活性化 / 抑制に対する c-Ski の作用. 第 62 回日本癌学会総会 名古屋 2003. 9. 25-27.
- 3) 伊東進、加藤光保. 血管内皮細胞における Notch シグナルと BMP シグナルのクロストーク. 第 62 回日本癌学会総会 名古屋 2003. 9. 25-27.
- 4) 鈴木裕之、八木健、近藤美幾、山根謙一、宮園浩平、加藤光保. TGF- β による c-myc 転写抑制における c-Ski の作用. 第 61 回日本癌学会総会 東京 2002. 10. 1-3.
- 5) 佐々木亨、八木健、古橋正男、八尾良司、諏佐真治、野田哲生、宮園浩平、加藤光保. c-myc における TCF/LEF 転写因子の結合部位の同定と TGF- β による抑制機構. 第 61 回日本癌学会総会 東京 2002. 10. 1-3.

国際学会

- 1) Sasaki T, Suzuki H, Yagi K, Furuhashi M, Yao R, Susa S, Noda T, Arai Y, Miyazono K, and Kato M. Lymphoid enhancer factor 1 makes cells resistant to transforming growth factor- β -induced repression of c-myc. FASEB Summer Research Conferences: The TGF- β Superfamily: Signaling and Development, Tucson, AZ 2003. July 12-17.

研究成果

TGF- β による *c-myc* の転写制御と癌における異常

血清刺激による *c-myc* の転写亢進と TGF- β による抑制に關与する *c-myc* 遺伝子の転写制御領域として TIE/E2F 配列を同定した。TGF- β シグナルによって Smad3 が活性化されると、Smad3 は、直接 TIE/E2F 配列に結合し、E2F-4 と転写共役因子 p300 の結合を解離させた（文献 1）。また、食道癌細胞株で、TIE/E2F 配列を介する転写が、TGF- β によっても血清飢餓によっても低下せず、恒常的に活性化している症例があることを見出した。

WNT シグナルによる *c-myc* の転写亢進の主要な標的配列のひとつとして、TBE3 配列を同定した。WNT シグナルや APC の異常によって β -カテニンの分解が低下すると、 β -カテニンは核内に移行し、TCF/LEF ファミリー転写因子群に結合することを介して、間接的に TBE3 配列に結合し、*c-myc* の転写を亢進する。正常大腸上皮は、TCF/LEF ファミリー転写因子群の中で主に TCF-4 を発現しているが、大腸癌細胞では、LEF-1 の発現が上昇している症例が多い。WNT シグナルのメディエーターとしては、TCF-4 と LEF-1 に大きな差がないため、癌細胞で LEF-1 の発現が亢進している症例が多いことの意義は、これまで不明であったが、本研究ではさらに、TGF- β シグナルによって Smad3 が核内に移行すると、TBE3 に TCF-4 が結合している場合には、TCF-4 と Smad3 の結合によって β -カテニンが TCF-4 から解離し、*c-myc* の転写がオフになるが、LEF-1 の場合には、Smad3 と β -カテニンの両者を同時に結合し、*c-myc* の転写がオンのままであることを見いだした。この発見により、TCF-4 から LEF-1 に換わることにより、TGF- β シグナル分子に異常がなくても、TGF- β による *c-myc* の転写抑制が解除され、ひいては TGF- β による増殖抑制に耐性となることが示唆された。（文献 2）

TGF- β シグナルによる標的遺伝子の転写制御に対する変異 Smad の抑制機序

Smad2D450E は、大腸癌で報告された Smad の点突然変異体で、受容体によってリン酸化されず、他の Smad と複合体を形成することもできない。この変異 Smad2 と相同な点突然変異を導入した Smad3D407E は、TGF- β I 型受容体に安定に結合して、TGF- β シグナルによる野生型 Smad2, Smad3 両者のリン酸化を抑

制した。一方、Smad2D450E は、Smad2 のリン酸化は抑制したが、Smad3 のリン酸化は抑制せず、Smad3 と Smad4 の複合体形成も低下しなかった。しかしながら、Smad2D450E の安定発現細胞株は、Smad2 を介する標的遺伝子の活性化も Smad3 を介する標的遺伝子の活性化も両方が低下しており、Smad の標的 DNA への Smad3 の結合も Smad2 の間接的結合と同様に低下していた。以上より、Smad2D450E は、Smad3D407E とは異なった核移行或いは核内の段階で Smad3 を介する転写制御を抑制することが示唆された（文献 3）。

TGF- シグナルによる標的遺伝子の転写制御に対する変異 c-Ski の抑制機序

c-Ski は、Smad に結合し、TGF- シグナルによって発現が誘導される標的遺伝子の転写を抑制する。これは、c-Ski が、ヒストンデアセチラーゼなど転写のコレプレッサーを結合することによると考えられている。私達は、TGF- シグナルによって転写が抑制される標的遺伝子に対する c-Ski の作用を調べ、この場合も、c-Ski は Smad による転写の抑制を解除することを見出した。c-Ski の、この作用は、これまで知られている c-Ski の作用機序では説明がつかず、新たな c-Ski の作用機序として、転写のオン・オフに関わらず、不活性な c-Ski-Smad 複合体が標的遺伝子上に長く留まることによる Smad の機能の抑制という機序の存在を示唆した（文献 4）。