

氏名(本籍)	なかの 中野 なおこ (東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第6209号
学位授与年月日	平成24年3月23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	TMEPAI 遺伝子の発現制御機構の解明及びそのファミリー分子 C18ORF1 の機能解析
主査	筑波大学教授 博士(理学) 入江 賢 児
副査	筑波大学准教授 博士(人間・環境学) 森川 一 也
副査	筑波大学講師 博士(医学) 坂田 麻実子
副査	筑波大学助教 博士(医学) 福田 綾

論文の内容の要旨

(目的)

TGF- β は、多くの細胞で細胞増殖抑制作用を有しているため、TGF- β の作用からの逸脱は様々ながんの原因の一つとなり得ると考えられている。著者の研究室で同定した、TGF- β によって発現が誘導される遺伝子である TMEPAI は、TGF- β シグナルのネガティブフィードバック機構に関与している。一方、TMEPAI は、幾つかの腫瘍において発現が亢進していることが知られており、がん細胞で過剰に発現した TMEPAI が TGF- β シグナルを抑制し、TGF- β による細胞増殖抑制作用が阻害され、細胞のがん化を亢進させている可能性がある。そこで、がん進展過程において TMEPAI 遺伝子の発現亢進が起こるメカニズムに迫る目的で、TMEPAI 遺伝子発現制御機構、および TMEPAI ファミリー分子 C18ORF1 の機能について研究が行われた。

(対象と方法)

TMEPAI の遺伝子発現機構を解明するために、TGF- β による転写活性化に必要なエンハンサー領域が、ルシフェラーゼ法、DNA タンパク質結合及びクロマチン免疫沈降法によって検討された。また、C18ORF1 が TMEPAI の機能を代替すると推測されることから、両分子の機能の比較、および両分子が協調して TGF- β シグナル抑制及び腫瘍形成亢進を行っているかという可能性について検討された。

(結果)

TMEPAI 遺伝子のプロモーター解析について、TMEPAI 遺伝子の第一イントロン内に TGF- β シグナルだけでなく、Wnt/ β -catenin/TCF7L2 シグナルによっても誘導されるエンハンサー領域が認められ、そのエンハンサー領域内に TCF7L2 が結合する新たな配列が見出され、TGF- β responsive TCF7L2 binding element (TTE) と命名された。さらに、TMEPAI 遺伝子の転写活性化には TTE の近傍に存在する Smad binding element (SBE) に Smad3 が結合し、DNA 上で TCF7L2 と Smad3 が複合体を形成していることが重要であることが明らかにされた。実際 TCF7L2 をノックダウンすると TGF- β によって誘導される TMEPAI 遺伝子の発現が抑制された。加えて、TMEPAI 遺伝子エンハンサー上の TTE に TCF7L2 が結合していること及び TGF- β 刺激による TMEPAI 遺伝子の転写活性化が TTE 領域を介して行われることが、抗 RNA ポリメラーゼ II 抗体による

ChIP アッセイ法により確認された。

TCF7L2 にはファミリー分子が存在し、ファミリー分子の1つである LEF1 は、TMEPAI 遺伝子のエンハンサーエレメントを挿入したレポーター pGL3ti-850 の活性を誘導することができなかった。そこで様々な変異体を作製し、この違いについて検討した結果、LEF1 には存在していない TCF7L2 の C 末端側が重要であることが示唆された。

次に、TMEPAI のファミリー分子が検索され、機能未知である C18ORF1 が単離された。C18ORF1 は TGF- β や BMP による誘導はおこらず、恒常的に発現していた。また C18ORF1 は、TMEPAI と同様に TGF- β シグナルを抑制するが BMP シグナルには影響しないということが見出された。また、C18ORF1 は、R-Smad である Smad2/3 と特異的に結合すること及び TGF- β による Smad2/3 のリン酸化を抑制するという結果が得られた。C18ORF1 の TGF- β シグナル抑制機構として、TMEPAI 同様に R-Smad を SARA と競合して奪い合うからではないかと推測され、検討されたところ、実際 Smad2 と SARA 間の結合を C18ORF1 が抑制するという結果が得られた。これらの結果から、C18ORF1 は TMEPAI と同様な抑制機構を介して TGF- β シグナルを抑制することが明らかにされた。

(考察)

本研究から、TMEPAI 遺伝子の第一イントロン内に TTE が見出された。また、TMEPAI の転写活性化には TCF7L2 と Smad が重要であり、TGF- β と Wnt シグナルが相乗的に TMEPAI 遺伝子の転写を活性化していることが示唆された。TCF7L2 の TTE への結合は、ALK5 の活性化型と Smad3 依存的に増強した。また、TMEPAI 遺伝子内に存在する TTE に TCF7L2 が結合していること、その結合は TGF- β 刺激依存的に強くなること、TGF- β 刺激時に TTE に RNA ポリメラーゼ II がリクルートされることが示された。すなわち、実際に TGF- β 刺激時に TTE を介して TMEPAI 遺伝子の転写が活性化されていることが示唆された。

TMEPAI 遺伝子の転写活性化に対する TCF7L2 と LEF1 の違いについて検討され、TCF7L2 の C 末端側に転写活性化に重要な配列が存在するということが示唆された。また、TCF7L2 の C-clamp 内の 463 番目のシステイン残基が Smad3 との結合部位である可能性が示唆された。これらのことから、TMEPAI 遺伝子の転写活性化には TCF7L2 と Smad3 が複合体を形成することが重要であることが示唆された。

C18ORF1 は、TGF- β や BMP による誘導は見られず恒常的に発現していること、TGF- β シグナルを抑制するが BMP シグナルには影響しないことが示された。また、C18ORF1 は TMEPAI 同様に、R-Smad を SARA と競合して奪い合うことで、Smad2 と SARA の結合を C18ORF1 が抑制するという結果が示された。これらの結果から、C18ORF1 は TMEPAI と同様な TGF- β シグナル抑制機能を持ち、代替するという可能性が示され、TMEPAI KO マウスにおける腫瘍形成能に変化が見られていない理由として、C18ORF1 が TMEPAI の機能を代替しているからではないかと推測された。C18ORF1 と TMEPAI が発現している臓器に相違があることから、C18ORF1 は常に TGF- β シグナルを抑制し、過剰にシグナルが入ることを抑制しているが、TGF- β シグナルが過剰に入ってしまった場合に TMEPAI が発現し、過剰な TGF- β シグナルを抑制するというような、場面ごとで働き方が違うという可能性が示された。

審査の結果の要旨

本研究では、TGF- β によって発現が誘導され、かつ、幾つかの腫瘍において発現が亢進している TMEPAI 遺伝子の発現制御機構が解析され、TMEPAI の転写活性化には、TCF7L2 と Smad が重要であることが明らかにされた。また、TGF- β と Wnt シグナルが相乗的に TMEPAI 遺伝子の転写を活性化していることが示唆された。さらに、TMEPAI ファミリー分子 C18ORF1 の機能が解析され、TMEPAI と同様な TGF- β シグナル抑制機能を持つことが明らかにされた。これらの本研究成果は、TGF- β による細胞増殖抑制作用の分子機構、

およびがん進展過程における TMEPAI 遺伝子の発現亢進機構を解明する上で重要な知見であり、高く評価される。

平成 23 年 12 月 22 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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。