

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名；多田敬一郎

本研究は TGF $\beta$ スーパーファミリーの細胞内情報伝達物質であり癌抑制遺伝子でもある Smad4 の機能を明らかにするために、主に他の Smad とのキメラ蛋白を作成する系をもちいて機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Smad2 と Smad4 はリセプターの刺激で 3 量体を形成するが、この中に Smad4 が占める割合を IP-Western 法を用いて検討した。その結果、Smad2 の発現量を変化させても Smad4 同士の結合は認められなかった。すなわち、Smad4 は活性型 Smad2 との 3 量体の中でも 1 分子しか存在しないことが示唆された。
2. H3/4loop と命名された Smad4 の MH2 領域に認められるに特異的な構造に着目して、他の Smad とのキメラ蛋白と Deletion Mutant の合計 4 種類を作成した。これらを用いて、Luciferase Assay をおこなった。Reporter Gene としては主に p3TP-Lux をもちいた。ここで、Smad2 とのキメラ蛋白である Smad4-HL2 は dose dependent に p3TP の転写活性を上昇することは認められた。
3. 次に Smad2 存在下で p3TP-Lux の転写活性能を検討した。Smad4-HL2 は Smad2 と協調することはできないことが示さ

れた。さらに Smad4-HL2 の作用を pAR3-Lux でも検討したが、Smad4-HL2 による高い転写活性は認めないことが示された。

4. Smad4HL2 による p3TP-Lux 活性のメカニズムの解明のため、Smad4 chimera 蛋白が Homo-oligomer 形成するかの検討を IP-Western 法を用いて行った。この結果、転写活性を有する Smad4-HL2 は多量体として存在していることが示唆された。
5. 次に Smad4-HL2 の DNA に対する結合をゲルシフトアッセイと DNA-affinity precipitation Assay で検討した。この結果 Smad4HL2 の DNA に対する結合能が Wild type に比較して強いことが示された。

以上、本論文は、活性化した Smad 複合体は 2 分子の Smad2 と 1 分子の Smad4 から形成されることを示し、さらに Smad の constitutive active form である Smad4-HL2 を作成し、そのメカニズムを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった Smad4 の MH2 領域  $\alpha$  helix3/4loop の機能解明と TGF $\beta$  スーパーファミリーの関連疾患に対する遺伝子治療に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。