

# 論文の内容の要旨

論文題目 Interaction and functional cooperation of  
PEBP2/CBF with Smads in  
Transforming growth factor- $\beta$  signaling

(TGF- $\beta$  スーパーファミリーのシグナル伝達系における  
Smad と PEBP2/CBF の物理的・機能的協調作用)

氏名 花 井 順 一

## 背景と目的

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、bone morphogenetic proteins (BMPs)、アクチビンを含む TGF- $\beta$  スーパーファミリーにおけるシグナル伝達は、Smad の発見により急速に進んだ。Smad はシグナル伝達因子であり、特異型 Smad、共有型 Smad、抑制型 Smad に分類される。リガンド刺激により活性化された I 型レセプターにより特異型 Smad がリン酸化され、共有型 Smad と複合体を形成して核へ移行し核内においては他の転写因子と協調して標的遺伝子の転写を調節することが明らかとなってきた。TGF- $\beta$  は強力な細胞増殖抑制因子であり、脾臓 B リンパ球において直接 IgA クラス・スイッチングを引き起こす。BMP は発生初期において重要な役割を演じ、また骨形成を方向づける。多彩な作用を有する TGF- $\beta$  / BMP シグナル伝達経路を明らかにする上で、これらのシグナルの核内ターゲットとして働き種々の生理的現象を調節する各転写因子を同定し、それらの調節機構を解明することが重要となってきた。

Polyomavirus enhancer binding protein2/core binding factor (PEBP2 / CBF) は、 $\alpha$  及び  $\beta$  サブユニットからなる転写複合体である。哺乳類では 3 種の  $\alpha$  サブユニットが同定されており、PEBP2 $\alpha$  A (本論文では以下  $\alpha$  A と記す)、PEBP2 $\alpha$  B ( $\alpha$  B)、PEBP2 $\alpha$  C ( $\alpha$  C) と命名されている。 $\beta$  サブユニットは哺乳類では 1 種であり、いくつかのスプライシング・バリエントが

存在する。αサブユニットは保存された Runt ドメインを有し、特異的な配列において DNA と結合し転写活性をもつ。βサブユニットは、それ自体では DNA に結合しないが、αサブユニットの DNA 結合を Runt ドメインとの結合を介して増強する。PEBP2/CBF は、ある特定の細胞の増殖と分化において重要な機能を発揮する。すなわち αA は骨形成において、αB は造血において決定的な役割を果たし、αC は脾臓 B リンパ球における germline 免疫グロブリン C α (IgCα) プロモーターを活性化することにより IgA クラス・スイッチングを引き起こす。病態との関わりにおいては、αA の 1 遺伝子座位の異常は、cleidocranialdysplasia syndrome (CCD) を呈し、αB はヒト白血病に伴う染色体転座において最も高頻度で切断点の集中する遺伝子である。PEBP2/CBF は、いくつかの転写因子やコアクチベーターと結合し、標的遺伝子の転写を調節することが明らかとなった。

BMP と αA が骨形成においてともに重要な役割を演じ、また TGF-β と αC が IgA クラス・スイッチングを調節している可能性があることから、本研究では、PEBP2 αサブユニットと Smad との物理的・機能的相互作用を解析することを目的とした。

## 研究方法

シグナル伝達因子 Smad の各アイソフォームと PEBP2 α との結合様式を、IP-Western 法により検出した。IgCα ナチュラル・プロモーターおよびそこに含まれる TGF-β responsive element (TβRE) ルシフェラーゼ法により、Smad3 と PEBP2 α C の転写活性化能の協調作用を検出した。さらに標的 DNA 上における結合様式をゲル・シフトアッセイにより解析した。

## 結果

### 1) PEBP2a サブユニットと特異型 Smad の結合

PEBP2/CBF の 3 種の a subunit (aA, aB, aC) は、それぞれ特異型 Smad (Smad1, 5, 2, 3) と結合する。特異型-Smad、共有型 Smad、PEBP2 a の 3 者による複合体は、ligand 刺激依存的に出現した。結合の特異性は aB, aC では明らかではなかったが、aA では Smad3 に比べて Smad1, 5 との結合がより強く見られた。結合部位は Smad の MH2 ドメイン、PEBP2a 側は複数の箇所認められた。

### 2) germline IgCα ナチュラル・プロモーター/TβRE を介するの転写活性化

germline IgCα プロモーターには TGF-β-responsive element (TβRE) が含まれており、さらにその部位には 2 つの Smad binding motif および、2 つの PEBP2 α binding site が認められる。このプロモーターを用いて Smad3 と PEBP2 α C の機能的連関を検討すると、ligand 刺激で誘

導される転写活性化は、 $\alpha$ Cの存在下で増強し、Smad3およびPEBP2 $\alpha$ Cが結合する部位に変異を導入するとligand刺激による転写活性化能は著しく減弱した。同様に、ligand刺激による転写活性化能はSmad3の dominant negative formにより阻害された。 $\alpha$ Cにおける転写活性化に重要なドメインはADである。

### 3) $\alpha$ C、 $\beta$ 2、Smad3複合体のDNA結合

T $\beta$ REをprobeとしてゲル・シフト法を行うと、T $\beta$ REに単独で結合するSmad3、PEBP2 $\alpha$ Cが認められた。両者はまた共存すると複合体を形成してT $\beta$ REに結合する。DNA側の各結合部位に変異を導入すると、Smad3/PEBP2 $\alpha$ C複合体、および変異部位に相当する蛋白の結合が消失した。以上から双方の結合モチーフが各蛋白のDNAとの結合において特異的であり、かつ必要であること、Smad3/ $\alpha$ C/ $\beta$ 2による複合体のDNA結合および転写活性化においては双方の結合モチーフが必要であることが示された。

### 考察

以上の結果から、PEBP2の各 $\alpha$ サブユニットと各特異型SmadがSmad4と共に複合体を形成することが明らかになった。さらに、この複合体形成が標的遺伝子の転写活性化に重要であることが、IgC $\alpha$ プロモーターを用いた検討により示された。以上の結果は、PEBP2がTGF- $\beta$ /BMPのシグナル伝達経路において核内ターゲットとして機能していることを示唆するものであり、SmadとPEBP2の協調作用によりTGF- $\beta$ /BMPのシグナルが調節されている可能性がある。

Smadは様々なDNA結合蛋白、また転写コアクチベーター、転写コレプレッサーTGIFと結合することが報告されている。TGF- $\beta$ スーパー・ファミリーの各因子は多彩な作用を有することを踏まえると、様々な転写関連因子との相互作用は、Smadが特定な種類の細胞で特異的な作用を発揮する上で必要であると思われる。c-JunあるいはVitaminDレセプターなどを含む多くのSmadの結合パートナーは、Smad3に優先的に結合する。一方*Xenopus* FAST1およびマウスFAST2は、Smad2に優先的に結合する。またホメオドメイン転写因子Hoxc-8は、主にSmad1と結合することが示されている。以上の観点からは、PEBP2はすべての特異型Smadと結合する点で、特異的である。

今回の検討で、シグナル経路特異的な、特異型SmadとPEBP2が結合すること、germline IgC $\alpha$ 一次転写物の転写におけるSmad3と $\alpha$ Cによる機能的協調作用がIgAクラス・スイッチングに必要であることを示した。この分子的機序の知見は、IgA腎症においてIgA産生が上昇していることの多いことの病態解明につながる可能性があるなど、臨床的にも意義があると思われる。TGF- $\beta$ スーパー・ファミリーの各因子は広く様々な生物学的な作用を有するゆえ、各作用において、PEBP2が核内ターゲットとして関与しているかどうか検討することが今後、重要となる。

## まとめ

1) 特異型 Smad と PEBP2 $\alpha$  の結合が確認された。これらの結合中で、 $\alpha$ A は BMP のシグナルをになう特異型 Smad との結合特異性が認められた。

2) IgC  $\alpha$  プロモーターを用いた検討では、特異型 Smad と PEBP2 $\alpha$  は機能的に協調し、また両者は複合体を形成して DNA と結合することが認められた。

以上から、特異型 Smad と PEBP2 $\alpha$  は結合し協調して標的遺伝子の転写活性を調節していると考えられる。

## 結論

PEBP2/CBF は Smad と複合体を形成し、TGF- $\beta$  スーパーファミリーのシグナル伝達経路における核内ターゲットとして機能している (図)。

## PEBP2 $\alpha$ /CBF is a nuclear target of Smads

