

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 11 年度博士課程入学
氏名 廣子 貴俊
指導教官名 秋山 徹

論文題目 TGF- β により誘導されるアポトーシスの分子機構

TGF- β (transforming growth factor- β) は、BMP やアクチビンなどとともに、共通した構造を有する分泌タンパクとして大きなファミリーを形成している。その生理作用は、増殖、分化、アポトーシスなど細胞の運命の制御、細胞外基質や細胞接着因子の発現調節による細胞外マトリックス形成、血管形成や新生、発生過程における臓器形成、生体における組織恒常性維持など極めて多岐にわたっている。したがって、TGF- β シグナル伝達経路の異常は、さまざまな疾患の原因と考えられる。特に、多くの癌細胞において TGF- β に対する不応性が報告されていることから、TGF- β シグナル伝達経路は癌抑制経路であると考えられている。これらの生理作用は、分泌された TGF- β が細胞膜上の TGF- β 受容体に結合し、Smad タンパク質を介して遺伝子発現調節を行うことで発揮される。よって、TGF- β シグナル伝達経路の標的遺伝子には、発癌の抑制に作用する遺伝子群が含まれると考えられている。

本研究では、TGF- β シグナル伝達経路による発癌の抑制メカニズムの解明のため、マイクロアレイを用い、TGF- β によって誘導される遺伝子を検索した。その結果、Bcl-2 や Bcl-xL などのアポトーシス抑制因子と結合し、アポトーシスの促進に関係する BH3-only タンパク質 Bim を見出した。BH3-only タンパク質は、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 サブファミリーとアポトーシス促

進因子である Bax サブファミリーの上流でアポトーシス誘導に作用する重要な制御因子と考えられている。アポトーシスは、Bcl-2 サブファミリーと Bax サブファミリーと BH3-only タンパク質のバランスで決定されることから、BH3-only タンパク質の修飾や発現誘導が、アポトーシスを直接誘導する。TGF- β により誘導されるアポトーシスの分子機構は、TGF- β 刺激による Bcl-xL の発現の抑制や caspase3 や caspase8 の活性化が報告されているが未知な部分が多い。そこで本研究では、TGF- β による Bim の発現制御や TGF- β により誘導されるアポトーシスに対する Bim の発現誘導の重要性について解析を行った。

1. Bim は TGF- β により発現誘導される

TGF- β シグナル伝達経路の標的遺伝子を単離するために、TGF- β による応答性が知られているヒト肺がん細胞 A549 に TGF- β を 1 時間処理し、得られた Poly(A)+RNA からサブトラクションライブラリーを作成し、マイクロアレイを用いて発現の変化する遺伝子を解析した。その結果、アポトーシスの促進に関係する BH3-only タンパク質 Bim を見出した。ノーザンハイブリダイゼーションにより Bim の発現量を経時的に確認した結果、Bim の発現量は TGF- β を処理して 2 時間後にピークに達し、その後は経時的に減少することが明らかになった。一方、ヒト肝臓がん細胞 Hep3B では、TGF- β を処理して 1 時間後にピークに達し、その発現量は維持されることが確認された。A549 細胞は TGF- β によりアポトーシスをおこさないが、Hep3B 細胞は TGF- β によりアポトーシスをおこすことが知られている。また、BH3-only タンパク質の発現量はアポトーシスの誘導に関係することから、この Bim の発現パターンの違いは TGF- β によるアポトーシス誘導に影響を与え、TGF- β による Bim の発現誘導を維持することが TGF- β によるアポトーシス誘導に重要である可能性がある。

TGF- β によって誘導されるアポトーシスが、標的遺伝子の発現のみで誘導されることを確認するために、Hep3B 細胞に TGF- β とタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを同時に処理をしてアポトーシスが誘導されるかどうかを検討した。その結果、TGF- β とシクロヘキシミドを同時に処理したものは、TGF- β によるアポトーシス誘導を阻害することが確認され、TGF- β によるアポトーシス誘導が、標的遺伝子の発現により誘導されていることが示唆された。

さらに、Bim 以外のアポトーシス促進因子である Bax サブファミリーの Bax と Bak、BH3-only タンパク質の Bik、Bad、Bid、Hrk/DP5 が、TGF- β によって発現誘導されるかどうかノーザンハイブリダイゼーションにより調べた。その結果、いずれも TGF- β による発現誘導は観察されず、TGF- β による発現誘導時の発現量は Bim が最も多いことが確認された。

次に、Bim が TGF- β シグナル伝達経路の直接の標的遺伝子であることを確認するために、Hep3B 細胞に TGF- β とシクロヘキシミドを同時に作用させ、ノーザンハイブリダイゼーションにより Bim の発現量を経時的に確認した。その結果、TGF- β とシクロヘキシミドを同時に処理しても Bim の発現誘導が維持されていることが確認された。このことから、TGF- β による Bim の発現誘導には、他の標的遺伝子の発現誘導は関係なく、TGF- β シグナル伝達経路の下流因子である Smad の関与が考えられた。

2. Bim は Smad タンパク質によって直接転写制御されている

TGF- β シグナル伝達経路の標的遺伝子は、TGF- β により活性化した Smad2 と Smad3 が Smad4 と四量体を形成して核に移行し、標的遺伝子のプロモーター内の Smad 結合配列 (Smad binding element : SBE) に結合することにより発現誘導される。TGF- β によって誘導されるアポトーシスに Smad3 が関係していることが報告されていることから、Bim のプロモーター領域が含まれると予想されるヒトゲノム DNA 断片の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポーターを作成し、Smad3 と Smad4 を強制発現してルシフェラーゼアッセイを行った。

まず、Bim の ORF より 5kb 上流までの DNA 断片の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポーターを作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、Smad3 と Smad4 依存的に転写活性化が見られた。このことにより、Smad3 と Smad4 が Bim の転写制御に関係していることが示唆された。この DNA 断片には SBE や SBE に類似した配列が 6 箇所存在することから、Smad による Bim の転写制御に関係している SBE を決定するために、DNA 断片を様々な長さに切断したコンストラクションを作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、Bim の ORF より 3.3kb 上流の DNA 断片では、Bim の ORF より 5kb 上流の DNA 断片と同等な転写活性が見られた。しかし、Bim の ORF より 2.4kb 上流の DNA 断片では、転写活性が見られなかった。これらの事実から、Smad による Bim の転写制御には、Bim の ORF より 2.4kb から 3.3kb 上流の領域が関係し、この領域内にある 2 つの SBE が重要である可能性が示唆された。

3. TGF- β によって誘導されるアポトーシスに対する Bim の発現誘導の重要性

Bim の転写制御に Smad3 と Smad4 の関与が示唆されたが、TGF- β シグナル伝達経路は様々なシグナル経路とクロストークをしていることが知られているため、TGF- β シグナル伝達経路のみが TGF- β により誘導されるアポトーシスに与える影響を検索した。Hep3B 細胞にドミナントネガティブタイプの TGF- β I 型受容体(T β R1-KN)とドミナントネガティブタイプの Smad4(DPC Δ C)を強制発

現した後 TGF- β で処理し、TGF- β により誘導されるアポトーシスに対する影響を検討した。その結果、T β R1-KN と DPC Δ C は TGF- β によって誘導される細胞死を抑制した。このことから、TGF- β I 型受容体から Smad4 への TGF- β シグナル伝達経路は TGF- β によるアポトーシス誘導に重要な役割を果たしていると考えられる。

Bim は BH3 ドメインを介して Bcl-2 や Bcl-xL と結合することによってアポトーシス抑制の機能を阻害し、アポトーシスを誘導すると考えられている。そこで、BH3 ドメインを含む様々な欠失変異体を作成し、Hep3B 細胞に強制発現することにより、Bim の細胞死に対する影響を検討した。その結果、BH3 ドメインより C 末端側の欠失変異体(Bim_s Δ N30)は細胞死に対する影響はなかったが、N 末端から 30 アミノ酸の欠失変異体(Bim_s Δ N51)は細胞死の誘導能が低下していた。また、N 末端から 51 アミノ酸の欠失変異体(Bim_s Δ N51)は細胞死の誘導能を失っていた。これらの事実から、Bim によるアポトーシスの誘導には、BH3 ドメインより N 末端側が必要であることが示唆された。また、Bim_s Δ N51 は細胞死の誘導能はないが、BH3 ドメインを含んでいるため Bcl-2 や Bcl-xL と結合すると考えられ、Bim に対するドミナントネガティブ効果が期待される。そこで、Bim と Bim_s Δ N51 を同時に強制発現すると、予想通り Bim による細胞死を抑制することが明らかになった。そこで、TGF- β による Bim の発現誘導が TGF- β によって誘導されるアポトーシスに関与しているかどうか調べるために、Hep3B 細胞に Bim_s Δ N51 を強制発現した後 TGF- β で処理し、TGF- β により誘導されるアポトーシスに対する影響を検討した。その結果、Bim_s Δ N51 は TGF- β によって誘導される細胞死を抑制した。このことから、Bim の発現誘導が TGF- β によるアポトーシス誘導重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究では TGF- β シグナル伝達経路の標的遺伝子として Bim を同定し、TGF- β により誘導されるアポトーシスに対して Bim が重要であることを述べた。TGF- β によるアポトーシス誘導は白血病や肝臓がんの発生の抑制に重要であることが報告されている。また、骨髄性白血病や肺腺腫で Bim の欠失が発見されていることから、Bim は癌抑制遺伝子として機能している可能性が推測される。